



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

Maestría en Biotecnología Industrial

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE
BIOMASA LÍQUIDA DE LEVADURAS CERVECERAS EN
BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO**

NAYADE MACIEL

Orientador: **Dr. Diego Gabriel Nosedá**

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

Mes – 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

Maestría en Biotecnología Industrial

Optimización del proceso de producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en biorreactor de tanque agitado.

NAYADE MACIEL

Orientador: **Dr. Diego Gabriel Nosedá**

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

Mes – 2021

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

Optimización del proceso de producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en biorreactor de tanque agitado

NAYADE GISSELLE MACIEL CACERES

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. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Autónoma de Barcelona, España

Prof. Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de la Pampa, Argentina

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

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 2021.

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

A Dios.
A mis padres.
A mi esposo.
A mis hijos.

AGRADECIMIENTOS

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 Dios por guiar desde el inicio mi camino.

A mis padres porque desde los trabajos más humildes se esforzaron por hacer de mí quien soy hoy.

A mi esposo por ser un apoyo en mis retos.

A mis hijos por darme el amor y la motivación para dar lo mejor de mí.

A mi familia por creer en mí y mis sueños.

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

Optimización del proceso de producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en biorreactor de tanque agitado

Autor: NAYADE GISSELLE MACIEL CACERES

Orientador: Dr. DIEGO GABRIEL NOSEDA

RESUMEN

Las levaduras, especialmente las de la familia Saccharomycetaceae se utilizan desde hace siglos para la obtención de diversos productos, como lo son los alimentos y bebidas fermentadas. En este sentido, la elevada demanda de los productos de fermentaciones en las últimas décadas ha generado un aumento en la producción de biomasa de levadura a nivel industrial. En particular, en Paraguay ha aumentado el número de cervecerías artesanales con una producción a escala intermedia quienes mayoritariamente importan la materia prima, como la levadura seca debido a las facilidades que esta presenta en cuanto al costo y mantenimiento.

El objetivo del presente trabajo de tesis es optimizar del proceso de producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras a partir de un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña clarificada. Dicha optimización se realizó a partir de cultivos a escala *Erlenmeyer* y mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado. En los ensayos se utilizaron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 la cual se utiliza para la fabricación de cerveza tipo Ale y *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 utilizada para la fabricación de cerveza tipo Lager. Estas levaduras fueron cultivadas en medio de cultivo tradicional YPD como control de crecimiento y rendimiento y en el medio alternativo con melaza de caña clarificada. Las fermentaciones de las levaduras se realizaron en biorreactor de tanque agitados bajo condiciones óptimas en ambos medios de cultivo, aplicando una estrategia de cultivo alimentado o *Fed-Batch*. Dichas fermentaciones en biorreactor de tanque agitado permitieron alcanzar mayores niveles de biomasa y la productividad volumétrica utilizando el medio de cultivo alternativo con melaza de caña, en comparación con el medio tradicional YPD el cual presenta un elevado costo encareciendo el proceso. Así, a partir de las fermentaciones en biorreactor se consiguió la producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras alcanzando elevados niveles de biomasa y productividad, en un medio de cultivo alternativo de bajo costo económico, lo que genera que dicho proceso de producción sea rentable.

Palabras claves: *Saccharomyces*, biomasa líquida, fermentaciones, biorreactor agitado, melaza de caña.

Optimization of the production process of liquid biomass from brewing yeasts in a stirred tank bioreactor

Author: NAYADE GISSELLE MACIEL CACERES

Advisor: Dr. DIEGO GABRIEL NOSEDA

SUMMARY

Yeasts, especially those of the Saccharomycetaceae family, have been used for centuries to obtain various products, such as fermented foods and beverages. In this sense, the high demand for fermentation products in recent decades has generated an increase in the production of yeast biomass at an industrial level. In Paraguay, the number of craft breweries with an intermediate-scale production has increased, who mostly import raw material, such as dry yeast due to the facilities it presents in terms of cost and maintenance.

The objective of this thesis work is to optimize the production process of liquid biomass of beer yeasts from an alternative culture medium based on clarified cane molasses. Said optimization was carried out from *Erlenmeyer* scale cultures and by fermentation in a stirred tank. In the tests, the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 which is used for the manufacture of Ale type beer, and *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 used for the manufacture of Lager type beer were used. These yeasts were cultivated in traditional YPD culture medium as growth and yield control and in the alternative medium with clarified cane molasses. Yeast fermentations were carried out in a stirred tank bioreactor under optimal conditions in both culture media, applying a *Fed-Batch* culture strategy. Said fermentations in a stirred tank bioreactor allowed reaching higher biomass levels and volumetric productivity using the alternative culture medium with cane molasses, compared to the traditional YPD medium, which presents a high cost, making the process more expensive. Thus, from the bioreactor fermentation, the production of liquid biomass from brewer's yeasts was achieved, reaching high levels of biomass and productivity, in an alternative culture medium with a low economic cost, which makes said production process profitable.

Keywords: *Saccharomyces*, liquid biomass, fermentations, agitated bioreactor, cane molasses.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Planteamiento del problema	1
1.2.	Pregunta de investigación.....	2
1.3.	Justificación.....	2
1.4.	Objetivos	2
1.4.1.	Objetivo General	2
1.4.2.	Objetivos Específicos	2
1.5.	Hipótesis.....	3
2.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1.	Melaza de caña	4
2.2.	Levaduras	5
2.2.1.	Generalidades	5
2.2.2.	Levadura cervecera	7
2.3.	Biorreactores de tanque agitado	9
2.3.1	Sistemas de Cultivo.....	9
2.3.1.1	Cultivo Discontinuo o <i>Batch</i>	10
2.3.1.2.	Cultivo semicontinuo o <i>Fed-Batch</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.4.	Fermentación Levaduras	10
3.	METODOLOGÍA.....	¡E
	rror! Marcador no definido.	
3.1	Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación.....	13
3.1.1	Cuantificación enzimática de glucosa.....	17
3.1.2	Cuantificación de azúcares reductores totales.....	18
3.2	Microorganismos	20
3.3	Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i>	20
3.4	Medio de cultivo a base de melaza de caña	21
3.5	Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio rico YPD.....	21
3.6	Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio alternativo a base de melaza de caña.....	22
3.7	Escalado de la producción de biomasa líquida de levadura en biorreactor de tanque agitado ...	23
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.	Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación	26
4.1.1.	Método de cuantificación de glucosa.....	26
4.1.2.	Método de cuantificación de azúcares reductores totales	27

4.2.	Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i>	30
4.3.	Medio de cultivo a base de melaza de caña.....	31
4.4.	Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i> en el medio de cultivo YPD.....	33
4.4.1.	Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio complejo YPD	34
4.4.2.	Crecimiento de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio complejo YPD.....	36
4.5.	Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio de cultivo a base de melaza de caña.....	38
4.5.1.	Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio a base de melaza de caña.....	39
4.5.2.	Crecimiento de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio de cultivo a base de melaza de caña.....	41
4.6.	Escalado de la producción de biomasa líquida de levadura en biorreactor de tanque agitado.....	44
4.6.1.	Escalado de la producción de biomasa líquida de levaduras en medio de cultivo YPD..	45
4.6.2.	Producción de biomasa de <i>Saccharomyces pastorianus</i> SafLager S-23 mediante fermentación en biorreactor con medio YPD.....	47
4.7.	Escalado de la producción de biomasa líquida de levaduras en medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	50
4.7.1.	Producción de biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SafAle US-05 en medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	50
4.7.2.	Producción de biomasa de <i>Saccharomyces pastorianus</i> SafLage S-23 en medio a base de melaza de caña.....	52
5.	CONCLUSIONES.....	57
6.	BIBLIOGRAFIA.....	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema de producción de azúcar orgánico a partir de caña de azúcar.....	4
Figura 2: A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observada al microscopio. B. ciclo de reproducción sexual y asexual de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figura 3: Esquema de un biorreactor de tanque agitado con sus partes.....	10
Figura 4: Pasos para la producción de levadura a nivel industrial.....	11
Figura 5: Esquema de un modelo de ajuste lineal.....	15
Figura 6: Esquema de la distribución de residuos.....	15
Figura 7: Variación esperada según la concentración de analito evaluada.....	16
Figura 8: Distribución normal de valor medio (Campana de Gauss).....	16
Figura 9: Recuperación esperada según la concentración de analito evaluada.....	17
Figura 10: Esquema de las reacciones del método de cuantificación de glucosa.....	17
Figura 11: Soluciones correspondientes al método de cuantificación de glucosa.....	18
Figura 12: Esquema de la reacción del método de cuantificación de azúcares reductores.....	19
Figura 13: Soluciones correspondientes al método de cuantificación de azúcares reductores.....	20
Figura 14: Biorreactor de tanque agitado de 2 litros (Bioflo 120) de <i>Eppendorf</i> en funcionamiento.....	23
Figura 15: Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de glucosa.....	26
Figura 16: Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de glucosa.....	27
Figura 17: Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores.....	28
Figura 18: Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de azúcares reductores.....	29
Figura 19: Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 20: Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de <i>Saccharomyces pastorianus</i>	31
Figura 21: Tinción de Gram del medio de cultivo incubado visto al microscopio óptico con un aumento de 40x.....	32
Figura 22: Melaza de caña clarificada y Melaza de caña sin centrifugación.....	33
Figura 23: Agar LB inoculado con caldo melaza de caña clarificada posterior a su autoclavado.....	33
Figura 24: Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD.....	34

Figura 25: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aplicando logaritmo natural.....	35
Figura 26: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Figura 27: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD.....	36
Figura 28: Cultivo de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio YPD.....	37
Figura 29: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Saccharomyces pastorianus</i> aplicando logaritmo natural.....	37
Figura 30: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces pastorianus</i>	38
Figura 31: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio YPD.....	38
Figura 32: Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio a base melaza de caña.....	39
Figura 33: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aplicando logaritmo natural.....	40
Figura 34: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Figura 35: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio a base de melaza de caña.....	41
Figura 36: Cultivo de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio de cultivo a base melaza de caña.....	41
Figura 37: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Saccharomyces pastorianus</i> aplicando logaritmo natural.....	42
Figura 38: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces pastorianus</i>	42
Figura 39: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio a base de melaza de caña.....	43
Figura 40: Registro de parámetros de la fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en biorreactor con medio YPD.....	46
Figura 41: Fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en biorreactor con medio de cultivo complejo YPD.....	46

Figura 42: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio en YPD en biorreactor de tanque agitado.....	47
Figura 43: Registro de parámetros de la fermentación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en biorreactor con medio YPD.....	48
Figura 44: Fermentación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en biorreactor con medio de cultivo complejo YPD.....	49
Figura 45: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio en YPD en biorreactor de tanque agitado.....	49
Figura 46: Registro de parámetros de la fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	51
Figura 47: Fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	52
Figura 48: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio a base de melaza de caña en biorreactor de tanque agitado.....	53
Figura 49: Registro de parámetros de la fermentación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	53
Figura 50: Fermentación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	54
Figura 51: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio a base de melaza de caña en biorreactor de tanque agitado.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones de operación en la etapa <i>Batch</i> de las fermentaciones realizadas en biorreactor de tanque agitado con los medios YPD y medio alternativo a base de melaza de caña.....	25
Tabla 2: Condiciones de operación en la etapa <i>Fed-Batch</i> de las fermentaciones realizadas en biorreactor de tanque agitado con los medios YPD y medio alternativo a base de melaza de caña.....	25
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.....	29
Tabla 4: Parámetros de crecimiento de cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio complejo YPD y medio de cultivo a base de melaza de caña.....	44
Tabla 5: Parámetros de crecimiento de cultivos en biorreactor de tanque agitado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces pastorianus</i> en medio de cultivo complejo YPD y medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....	55

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

R²: Coeficiente de correlación

RSD %: Desviación estándar residual

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalisílico

KOH: Hidróxido de potasio

NaOH: Hidróxido de sodio

DO: Densidad Óptica

O₂d: Oxígeno disuelto

μl: Microlitro

g/L: gramo/litro

g_x/g_s: gramo de biomasa/gramo de sustrato

h⁻¹: 1/hora

L/h: litro/hora

X: Concentración de biomasa

Y_{x/s}: Rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido

S_R: Concentración de la fuente de carbono en el reservorio de alimentación

F: Flujo de alimentación

V: Volumen de cultivo

μ: Velocidad específica máxima de crecimiento

r_s: Velocidad volumétrica de consumo sustrato

q_s: Velocidad específica de consumo de sustrato

P_v: Productividad volumétrica de biomasa

P_{v Max}: Productividad volumétrica máxima de biomasa

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas los procesos fermentativos son utilizados ampliamente para la obtención de productos de interés como metabolitos, biomasa, fármacos, alimentos, etc. En la actualidad la biotecnología se ocupa de optimizar estos procesos de producción de una forma rentable, es decir con un enfoque en la reducción de costos y aumento rendimiento y productividad (Cardozo y Moreno, 2012; Singh, *et. al.*, 2017).

La utilización de subproductos procedentes del sector agroindustrial parece responder a ambas necesidades, ya que aporta a la disminución de posibles contaminantes, disminuye los costos de producción, se encuentran altamente disponibles y al ser una fuente rica en carbohidratos podría aumentar la productividad del proceso (Grande, 2016). La melaza de caña de azúcar es un subproducto de la industria azucarera la cual tiene diversas aplicaciones industriales, debido a su alto porcentaje de carbono orgánico, vitaminas, aminoácidos, etc. (Valencia y Zapata, 2014).

Saccharomyces sp es la levadura productora de etanol por excelencia, ampliamente utilizada para la elaboración de pan y bebidas alcohólicas. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Sacharomyces pastorianus* son las más utilizadas en la producción de cerveza, que es una de las bebidas alcohólicas más consumida a nivel mundial (Ferreira, *et. al.*, 2010).

A nivel nacional se produce levadura seca y fresca para la industria panadera, utilizando melaza de caña como fuente de carbono; pero no se produce levaduras cerveceras, por lo que los cerveceros artesanales deben importarlas como casi todos sus insumos para la producción, esto podría ser una brecha aprovechable por profesionales nacionales de las diferentes áreas.

El objetivo de este trabajo es evaluar la producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras a nivel *Erlenmeyer* y mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado, utilizando un medio a base de melaza de caña clarificado como fuente de carbono; y analizando parámetros estequiométricos y cinéticos del proceso.

1.1. Planteamiento del problema

Actualmente, en Paraguay la mayoría de los insumos de la industria cervecera son importados. Este es un mercado potencial para explotar por profesionales nacionales; además, la importación de estos insumos puede presentar diferentes inconvenientes, desde el costo elevado hasta el deterioro de la calidad de los insumos por el tiempo de envío.

En cuanto a la importación de levadura se estima, que desde el momento de envasado la viabilidad celular disminuye en un 4% mensual para la forma liofilizada y 21% para la forma líquida almacenándola en condiciones óptimas (González, 2017).

1.2. Pregunta de investigación

¿El medio de cultivo a base de melaza de caña clarificado permite una producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras con similar eficiencia que el medio YPD con peptona y extracto de levadura?

1.3. Justificación

En los últimos años en Paraguay se ha visto el aumento de cervecerías artesanales, cuyos productos son ampliamente aceptados por el público. La calidad de la cerveza depende de diferentes factores, sin embargo, el principal sería el tipo de levadura a utilizarse en el proceso de producción. El uso de levadura seca activa (liofilizada) en la industria cervecera presenta interés debido a su capacidad para almacenarse de manera sencilla y prepararse rápidamente para su utilización. Sin embargo, algunos estudios han informado que pueden producirse efectos indeseables cuando se emplean cepas de lager en forma seca o liofilizada, como floculación anormal, formación de turbidez y una estructura de espuma menos estable. Estos efectos se han relacionado con una viabilidad reducida, causada por la muerte celular durante los procesos de secado y rehidratación. (Jenkins, *et al.*, 2011).

Por tal motivo, existe la necesidad de proveer a la industria artesanal de levaduras cerveceras en forma líquida, para lograr disminuir los efectos negativos mencionados y a la vez que no implique el aumento del costo del proceso de producción de cerveza.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras a partir de un medio de cultivo a base de melaza de caña clarificada, mediante crecimiento a escala *Erlenmeyer* y mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado.

1.4.2. Objetivos Específicos

- a) Comparar el crecimiento de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio a base de melaza de caña clarificado con el crecimiento en el medio estándar YPD.
- b) Comparar el crecimiento de una cepa de *Saccharomyces pastorianus* en un medio a base de melaza de caña clarificado con el crecimiento en el medio estándar YPD.

- c) Escalar la producción de biomasa líquida de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de frasco *Erlenmeyer* a un biorreactor de tanque agitado.
- d) Escalar la producción de biomasa líquida de una cepa de *Saccharomyces pastorianus* de frasco *Erlenmeyer* a un biorreactor de tanque agitado.

1.5. Hipótesis

H₀: No es factible producir biomasa líquida de levaduras para cervecería utilizando un medio de cultivo económico a base de melaza de caña clarificado

H₁: Es factible producir biomasa líquida de levaduras para cervecería utilizando un medio de cultivo económico a base de melaza de caña clarificado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Melaza de caña

La melaza de caña es el residuo final generado a partir del proceso de obtención de sacarosa de la caña de azúcar mediante cristalización repetida. El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido hasta el punto en el cual la elevada viscosidad de la melaza de caña no permite una cristalización adicional de la sacarosa. Para maximizar la producción de azúcar, la melaza puede pasar por este proceso varias veces; esta reutilización es inversamente proporcional a la calidad final de la melaza para procesos fermentativos (Olbrich, 1963). En la **Figura 1** se describe el proceso completo de producción de azúcar a partir de la caña de azúcar, a partir del cual se genera también la melaza.

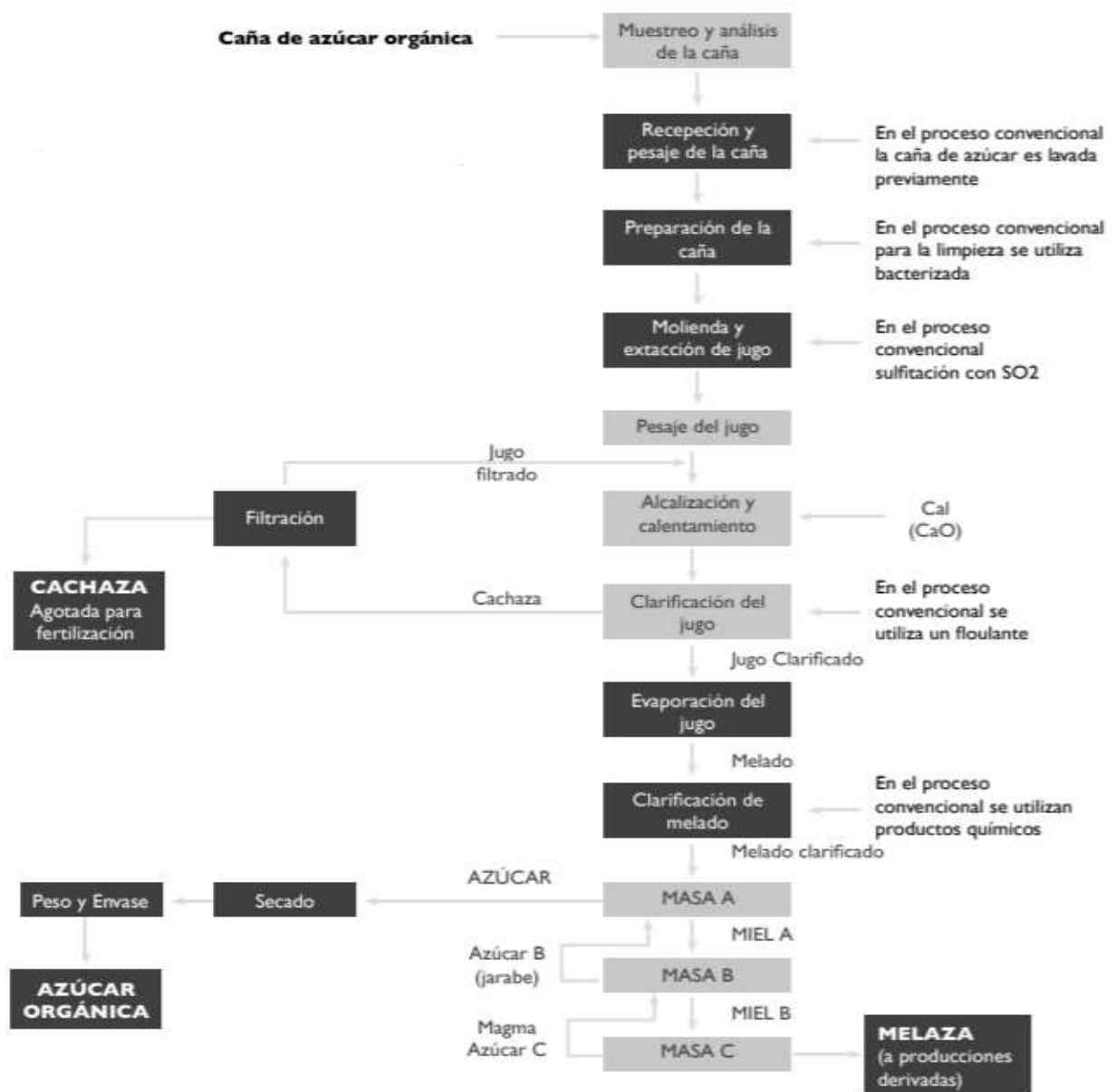


Figura 1: Esquema del proceso de producción de azúcar a partir de caña de azúcar (Friedmann et al., 2010).

Si bien la melaza se puede obtener también a partir de otras fuentes como frutas cítricas y remolacha, en Paraguay se elabora el azúcar refinado y su derivado residual la melaza a partir de caña de azúcar, ya que es el país con mayor producción de este cultivo a nivel mundial con una producción de 5.932.463 toneladas en el periodo 2019/2020 (Enciso, 2019).

La melaza contiene la mayor parte de los compuestos no azucarados presentes en el jugo, sacarosa y azúcares reductores, además de sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. La composición de la melaza es muy variable dependiendo de la variedad de caña de azúcar, y sus características de cultivo en general, así como su procesamiento a nivel industrial. Así, en general los componentes principales de la melaza de caña son los siguientes azúcares: sacarosa (32 %), glucosa (14 %) y fructosa (16 %) (Olbrich, 1963).

La melaza de caña al ser un compuesto rico en azúcares es ampliamente utilizada como sustrato en diferentes bioprocesos a niveles industriales, que van desde obtención de etanol (Argote, *et. al.*, 2015) hasta producción de proteína recombinante (Martínez, 2015) o generación de electricidad en pilas microbianas (Hassan, *et. al.*, 2019). Sin embargo, esto no implica que todos los microorganismos puedan crecer de manera eficiente en medios con melaza de caña; debido a que en contrapartida a los azúcares se pueden encontrar compuestos tóxicos e inhibidores de la fermentación, alta salinidad, osmolaridad, etc.

2.2. Levaduras

2.2.1. Generalidades

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares capaces de reproducirse asexualmente, ya sea por gemación o por fisión binaria; y sexualmente, mediante la formación de ascosporas o basidiosporas, así como también pueden formar esporas que no están encerradas en un cuerpo fructífero. Las levaduras son microorganismos que poseen la capacidad fisiológica de adaptarse a cualquier tipo de ambiente, siendo este el motivo por el cual pueden encontrarse en diferentes ecosistemas (en el suelo, aire o ambiente acuático) hasta en la superficie de la piel y en el tracto intestinal de animales de sangre caliente (Oliveira, 2013).

Históricamente, las levaduras han sido utilizadas en la elaboración de bebidas alcohólicas y alimentos fermentados desde la antigüedad. En cambio, su modo de cultivo fue descrito por el microbiólogo francés Louis Pasteur recién en el siglo XIX (Suarez-Machín, *et. al.*, 2016). Actualmente las levaduras son utilizadas para diversos fines tales como alimentación animal, probióticos, producción de enzimas recombinantes; además, son un pilar fundamental en diversos tipos de industrias alimenticias para la producción de cerveza, pan, vino y queso (Suarez-Machín, *et.*

al., 2016; Bautista-Justo, *et. al.*, 2001). En la **Figura 2** se exhibe una imagen al microscopio de *Saccharomyces cerevisiae* y se indica su ciclo de reproducción sexual y asexual.

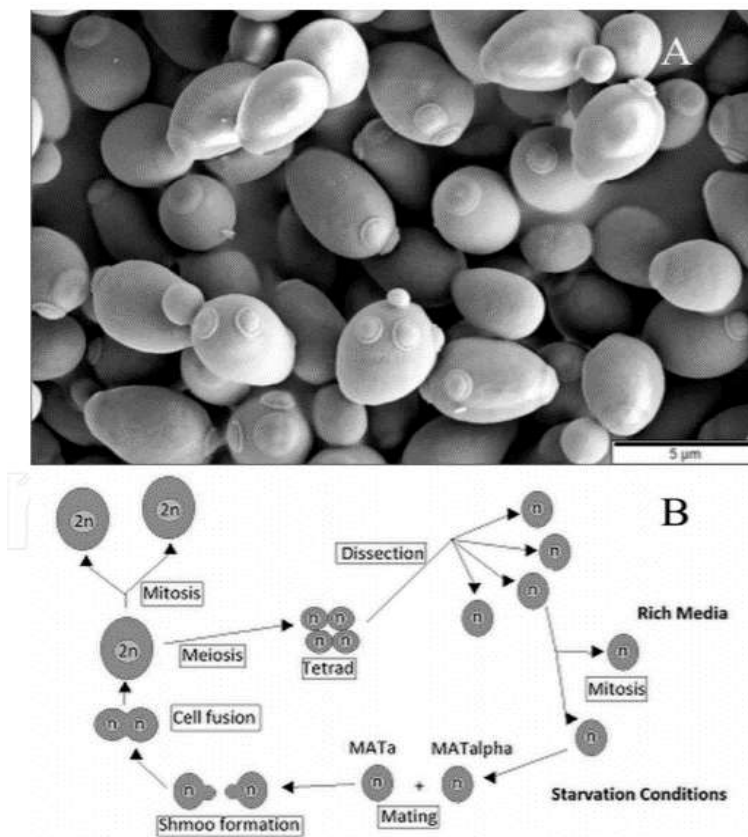


Figura 2: A. *Saccharomyces cerevisiae* observada al microscopio. B. ciclo de reproducción sexual y asexual de *Saccharomyces cerevisiae* (Bernstein, H. y Bernstein, C., 2019).

Las levaduras tienen la capacidad de metabolizar diversos sustratos como pentosas, hexosas o disacáridos. Poseen dos rutas metabólicas para asimilación de sustratos, en caso de asimilación de sustratos en condiciones aeróbicas se denomina respiración o metabolismo respiratorio. Por otro lado, la asimilación de sustratos en condiciones anaeróbicas se denomina fermentación o metabolismo fermentativo (Oliveira, 2013).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más ampliamente conocida y utilizada en la producción de bebidas alcohólicas y panificados. Su hábitat natural es la superficie de distintas frutas. Es considerado un organismo modelo, ya que su composición bioquímica y genética es conocida a profundidad. Tal como se mencionó, dependiendo de la presencia o no de oxígeno puede presentar metabolismo respiratorio o fermentativo (Oliveira, 2013). En presencia de oxígeno la glucosa se consume por completo en la mitocondria de la célula; mientras que, en ausencia de oxígeno, la glucosa registra un consumo parcial en el citoplasma celular. En *Saccharomyces sp* el aporte de oxígeno a un cultivo de levaduras creciendo en condiciones de anaerobiosis, producirá una

disminución en la metabolización de la glucosa, este proceso es denominado Efecto Pasteur. El Efecto Pasteur ocurre debido a la inhibición de la fosfofructoquinasa por la producción de ATP durante la respiración (Obregón, 2013).

Saccharomyces cerevisiae se conoce como una levadura Crabtree positiva, ya que es capaz de producir etanol aeróbicamente en presencia de altas concentraciones externas de glucosa. Estas altas concentraciones promueven la aceleración de la glucólisis, produciendo cantidades apreciables de ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato (Obregón, 2013).

Saccharomyces pastorianus es un híbrido que involucra a *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*, se especula que el evento de hibridación de estos dos condujo a la formación de una levadura alotetraploide. Seguido por una reordenación del genoma por mitosis, lo que derivó en la pérdida de heterocigosidad y cromosomas quiméricos recombinantes. Esta reordenación genómica probablemente fue limitada y conformada por diferencias en la organización cromosómica e incompatibilidades genéticas que dieron como resultado combinaciones genéticas letales (Gibson *et. al.*, 2015).

2.2.2. Levaduras cerveceras

Existe un vasto conocimiento sobre el comportamiento de las levaduras utilizadas a nivel de laboratorio cuya característica genética es haploidía o diploidía, mientras que las levaduras utilizadas para la fabricación de cerveza se definen típicamente como poliploides. Esto se debe a que los cromosomas están presentes en números diferentes, lo que produce una ploidía que no se puede describir como una o dos veces el complemento normal (Jenkins, 2011).

La propagación de levaduras es una práctica estandarizada en las industrias y su uso se prioriza al de la levadura seca activa (liofilizada). Estas requieren de la rehidratación antes de utilizarlas y se ha demostrado que este proceso afecta la viabilidad celular. Cabe mencionar que, el grado de pérdida de la viabilidad depende de las condiciones de cada cepa y la rehidratación (Jenkins, 2011). Esto es un factor crucial en el proceso de elaboración de cervezas, ya que para la preparación de un producto de calidad se necesita una levadura no estresada, altamente vital y viable (Nielsens, 2010).

La levadura seca activa consiste en biomasa de células de levadura con un peso seco de 93-95%. Para ello se realiza una deshidratación de la biomasa de levaduras en dos fases, en la primera se elimina el agua por filtración al vacío, y posteriormente, el agua restante se elimina utilizando un secador de lecho fluidizado. Luego de este proceso las células de levadura se encuentran en un estado latente, que al rehidratarse recuperan su función metabólica. Durante estos procesos ocurre la muerte celular que es atribuible a la gran cantidad de tensiones generadas durante la deshidratación (Jenkins,

2011); entre estas tensiones se encuentran primero y principalmente el estrés osmótico producido por la pérdida de agua, además del estrés oxidativo (Pérez-Torrado *et. al.*, 2005).

Se conoce que, durante la deshidratación hay un aumento de la expresión de los genes implicados en el catabolismo de los ácidos grasos, la gluconeogénesis y el ciclo del glioxilato (Jenkins, 2011). El estrés osmótico se produce en primera instancia durante la propagación de la levadura, por la gran concentración de azúcares presente en los medios de cultivo. Posteriormente, durante la deshidratación ocurren una serie de eventos que parecen estar relacionados con la muerte celular; por ejemplo, el flujo de agua a través de la membrana celular provoca el colapso del citoesqueleto. Por otra parte, la contracción celular que ocurre ocasiona la ruptura de la membrana plasmática, así como también conduce a una aglomeración citoplásmica, promoviendo interacciones moleculares potencialmente dañinas en la célula. Además, puede ocurrir que las células realicen modificaciones estructurales transitorias, como el engrosamiento de la pared celular, la reorganización del citoesqueleto de actina y cambios en la fluidez de la membrana. Además, el estado seco o liofilizado de la levadura produce un efecto perjudicial sobre la fisiología celular alterando la estructura y función de la vacuola; así como, la integridad y funcionalidad de las membranas nucleares y celulares (Rodríguez, *et. al.*, 2012).

En contrapartida, las células de levadura tienen estrategias para contrarrestar el estrés osmótico, como por ejemplo poseen canales de proteínas, llamadas acuaporinas que facilitan el flujo de agua, reduciendo así el daño (Tanghe, *et. al.*, 2002). Asimismo, las levaduras son capaces de acumular el osmolito glicerol, a fin de equilibrar la presión osmótica total. También pueden acumular el disacárido trehalosa, que posee funciones protectoras de las membranas celulares (Jenkins, 2011).

Otro tipo de estrés es el oxidativo, el cual ocurre debido a la producción de especies reactivas de oxígeno, estas no solo se generan durante la producción de levadura seca activa; sino que también son generadas por las mitocondrias durante el metabolismo aeróbico normal. Tras la deshidratación, las células de levadura pueden mostrar un aumento de más de 10 veces del nivel de la oxidación intracelular. El estrés oxidativo generado durante la producción de levadura seca se suma al estrés que la levadura puede experimentar durante la fermentación, como el estrés químico producido por la acumulación de etanol, además del contacto con compuestos azufrados y fenólicos (Vital y Larralde, 2016). La acumulación de trehalosa y glicerol pueden proteger del daño oxidativo (Jenkins, 2011).

Por lo mencionado anteriormente, se ha demostrado que la levadura deshidratada pierde hasta el 30% de los compuestos celulares solubles cuando se rehidrata, lo cual afecta principalmente la funcionalidad de la membrana celular. Debido a esto la rehidratación adecuada es la única forma de asegurar la viabilidad de las células sanas que conducen a una fermentación eficiente siendo factores claves la temperatura y la composición del medio de rehidratación (Rodríguez, *et. al.*, 2012; Jenkins, 2011).

2.3. Biorreactores de tanque agitado

Un biorreactor de tanque agitado es un recipiente en el cual se proveen las condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento de microorganismos con el fin de obtener productos de interés, bajo condiciones controladas. Los biorreactores permiten generar un ambiente óptimo, y satisfacer los requerimientos nutricionales y ambientales en pos de facilitar el crecimiento y actividad biológica de los microorganismos que se cultivan (Bertola, *et. al.*, 1999).

Todo biorreactor debe cumplir con ciertos requisitos, además de asegurar un ambiente uniforme y adecuado, debe mantener el medio homogéneo sin zonas muertas y transferir de manera eficiente el oxígeno al medio de cultivo empleado (Luján y Yparraguirre, 2006). Los accesorios y sensores de los biorreactores agitados permiten al monitoreo y control continuo de gases (aire, O₂, CO₂, N₂), agitación, pH, temperatura, biomasa, y nivel de espuma. Asimismo, la contaminación del medio de cultivo se previene al realizar la esterilización del biorreactor junto con los sensores y accesorios que tendrán contacto con el medio (Panda, 2011). En la **Figura 3** se detallan las partes de un biorreactor de tanque agitado.

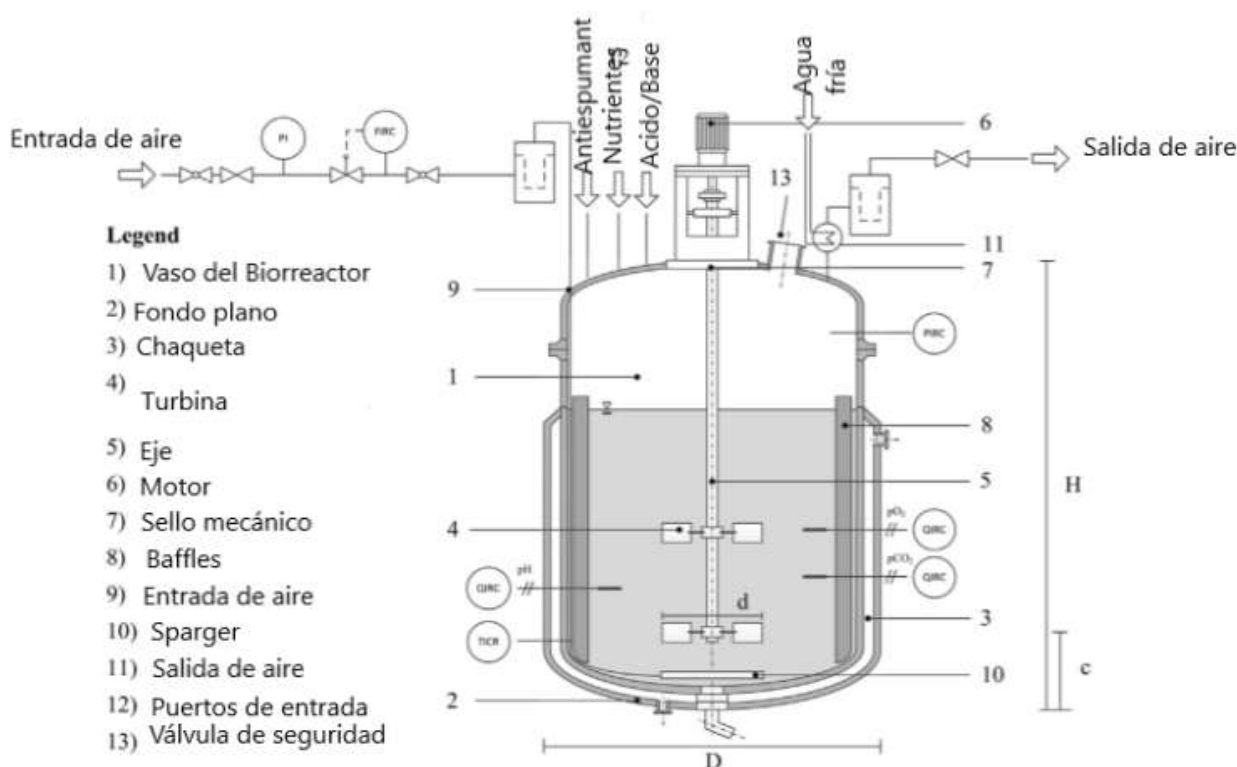


Figura 3: Partes de un biorreactor de tanque agitado.

Los procesos fermentativos que se desarrollan en los biorreactores de tanque agitado pueden ser aerobios o anaerobios, dependiendo del objetivo del proceso de producción. Los microorganismos utilizados en procesos fermentativos consumen una o varias fuentes de carbono, principalmente azúcares fermentables con el fin de crecer, generar biomasa y obtener diversos productos

biotecnológicos. A nivel industrial, mediante fermentación en biorreactores de tanque agitado se producen compuestos farmacéuticos, como antígenos y hormonas recombinantes, insumos alimenticios como bioedulcorantes y enzimas hidrolíticas, y biocombustibles como bioetanol (Yang y Sha, 2020).

2.3.1. Sistemas de Cultivo

2.3.1.1. Cultivo Discontinuo o *Batch*

Un cultivo discontinuo o *Batch*, es un sistema de cultivo en donde los microorganismos crecen a partir de una concentración inicial de nutrientes y con ciertas condiciones de cultivo (pH, temperatura, oxígeno disuelto, velocidad de agitación, etc.), manteniéndose constante el volumen. En un biorreactor dichas condiciones de operación pueden ser monitoreadas y ajustadas por el operador a través del sistema de control del biorreactor (Panda, 2011). Es un sistema simple de operar, ya que el proceso finaliza cuando los microorganismos consumen todo el sustrato. Una ventaja con este tipo de sistemas es que puede hacerse un seguimiento de la evolución del proceso, y conocer el tiempo en el que se alcanza el punto en donde existe agotamiento de nutrientes, por lo que este tipo de sistemas es conveniente para conocer la cinética de crecimiento del microorganismo en estudio, y optimizar el proceso (Bertola, *et. al.*, 1999; Yang y Sha, 2020).

2.3.1.2. Cultivo alimentado o *Fed-Batch*

El cultivo alimentado o *Fed-Batch*, es un sistema de cultivo en el cual el cultivo microbiano se alimenta con nutrientes a un determinado flujo constante o exponencial. Este sistema de cultivo permite obtener mayores niveles de biomasa y de productos en comparación con el sistema *Batch*.

Los sistemas de cultivo alimentado, a diferencia de los discontinuos y continuos, finalizan el proceso con un volumen superior al inicial. Para llevar a cabo este tipo de cultivo, los microorganismos se inoculan y se cultivan inicialmente en régimen discontinuo o *Batch* durante un cierto periodo de tiempo, para luego iniciar la etapa *Fed-Batch* en la cual se adicionan nutrientes al cultivo a lo largo del tiempo de fermentación. El crecimiento en la etapa *Fed-Batch* puede ser exponencial o lineal según el flujo de alimentación sea exponencial o constante, respectivamente. La alimentación o adición de nutrientes se inicia normalmente cuando ocurre la limitación de la fuente de carbono que es el sustrato limitante del crecimiento. La adición de nutrientes se realiza de tal forma que no sea excesivo y el crecimiento microbiano pueda soportarlo. Una vez que finaliza la fermentación se cosecha el cultivo y se centrifuga para obtener por separado la biomasa celular y los productos de interés solubles en sobrenadante. En definitiva, el sistema de cultivo alimentado o *Fed-*

Batch es utilizado en bioprocesos que tengan como finalidad obtener un elevado nivel de biomasa celular y/o alto rendimiento de productos biotecnológicos (Yang y Sha, 2020).

2.4. Fermentación de levaduras

Las fermentaciones son una de las prácticas y tecnologías más antiguas llevadas a cabo por el hombre. Por miles de años se utilizó la capacidad fermentable que poseen muchos microorganismos, entre ellas las levaduras, para la elaboración de distintos alimentos como el pan a partir del 4000 A.C. y los productos derivados de la fermentación láctica como el queso y yogur (Scragg, 1991). Las levaduras son microorganismos de gran importancia en la industria biotecnológica y alimentaria debido a su utilización en diversos procesos productivos. El crecimiento intensificado de levaduras en medios de cultivo adecuados es beneficioso para distintos fines básicos e industriales (Sobieszuk, *et al.*, 2020).

El término fermentación presenta varios significados y definiciones, en principio, a nivel bioquímico se refiere a un mecanismo de generación de energía por el catabolismo de compuestos orgánicos. Por otro lado, a nivel microbiológico industrial, el término fermentación, describe el proceso por el cual se realiza el crecimiento de microorganismos en biorreactores para la obtención de diversos productos de interés. Por último, el término fermentación también se puede referir al procesamiento de alimentos con microorganismos para obtener alimentos fermentados (Hensirisak, 1997).

Los procesos fermentativos con microorganismos en biorreactores implican reacciones enzimáticas donde algunos sustratos son aprovechados y transformados por acción de los microorganismos, los cuales aumentan en cantidad en función al tiempo y pueden generar distintos productos de interés (Hensirisak, 1997).

Los procesos fermentativos en biorreactores que involucran el crecimiento de microorganismos como las levaduras, pueden ser desarrollados de manera aeróbica o anaeróbica, dependiendo del producto final que se desee obtener. Asimismo, las características del crecimiento de las levaduras pueden variar dependiendo de las condiciones a las que estén sujetas las células (Scragg, 1991; Barford, 1990; Barford, 1987; Liviense y Lim, 1982). En particular, un proceso fermentativo de gran interés e importancia es la producción de biomasa de levaduras cerveceras, mediante sistemas de cultivo *Fed-Batch* en biorreactores de tanque agitado para su posterior utilización en la fabricación de diversos tipos de cervezas, ya sea a nivel artesanal o industrial.

En la **Figura 4** se describe el proceso de producción de biomasa de levadura mediante fermentación en biorreactores a nivel industrial. Este proceso implica múltiples fermentaciones realizadas en distintas etapas empleando un medio de cultivo con melaza de caña, que aporta sacarosa como principal fuente de carbono para la levadura. El proceso de producción se inicia inoculando la

cepa de levadura seleccionada en un frasco *Erlenmeyer* conteniendo el medio de cultivo a base de melaza de caña. Posteriormente, el primer fermentador se inocula con el cultivo inicial mencionado. Luego en una secuencia de fermentaciones consecutivas, la biomasa cultivada en biorreactores más pequeños actúa como inóculo para los biorreactores de mayor volumen.

En las primeras etapas del proceso de producción de biomasa se realizan fermentaciones aplicando un modo de cultivo *Batch*, aumentando sucesivamente el volumen del reactor. En las siguientes fermentaciones se aplica un sistema de cultivo *Fed-Batch*, alimentando el cultivo con una solución concentrada de melaza de caña. Los principales parámetros controlables durante la producción de biomasa son la temperatura y la aireación. El nivel de aireación es un parámetro fundamental para la producción de biomasa a escala industrial, ya que la presencia permanente de O_2 permite la generación de lípidos y así, revitalizar la población celular deficiente en esteroides que aseguren que la fermentación pueda proceder de manera eficiente (Pérez-Torrado, *et. al.*, 2015).

Finalmente, luego de la última fermentación *Fed-Batch* en el biorreactor de mayor volumen, tiene lugar la etapa de centrifugación del cultivo, y posteriormente la biomasa húmeda es sometida a las etapas de extrusión y desecación, obteniendo así biomasa de levadura seca.

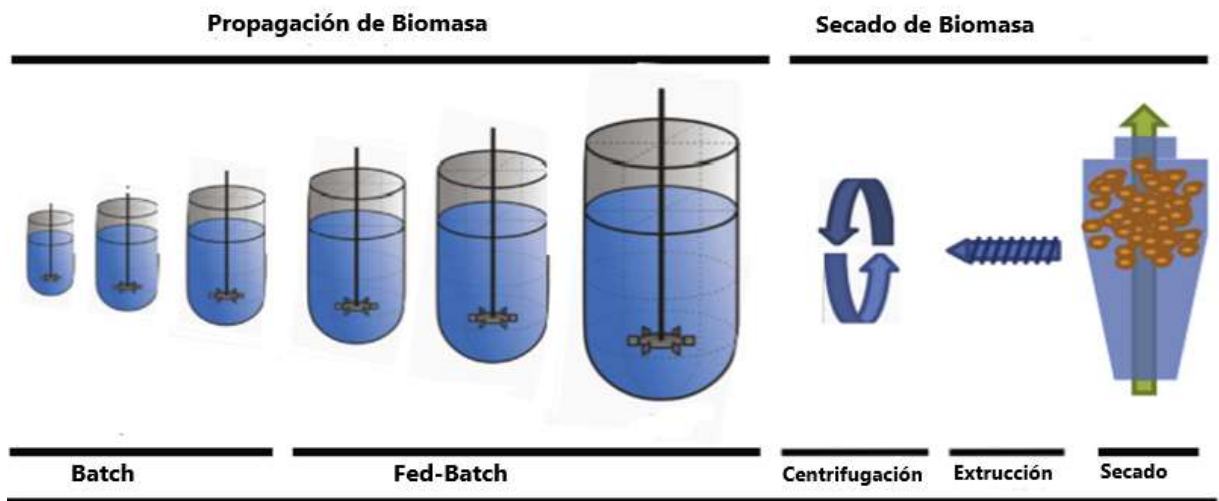


Figura 4: Etapas del proceso de producción de biomasa de levadura a nivel industrial (Pérez-Torrado, *et. al.*, 2015).

3. METODOLOGÍA

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Laboratorio de Biotecnología Industrial y de Bioprocesos y el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), Universidad Nacional de Asunción (UNA).

3.1 Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación

La validación de un método analítico es un procedimiento que, por medio de análisis de laboratorio y fundamento estadístico, demuestra que un método cumple con las características de desempeño adecuadas para su uso previsto (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

Por lo tanto, la puesta a punto y validación de los métodos de cuantificación de glucosa y azúcares reductores se realizó aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad tal como se describen a continuación:

Ensayo de Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico, de dar una respuesta que sea proporcional a la cantidad del analito dentro de un intervalo dado, esto se habrá de determinar en la muestra de laboratorio (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

Para este ensayo se prepararon por triplicado 5 concentraciones independientes de cada estándar tal de abarcar el rango lineal de absorbancia del espectrofotómetro. Las concentraciones utilizadas para el método de cuantificación de glucosa y 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 glucosa (Anedra, lote: 28910-1).

Las soluciones de los estándares fueron analizadas aplicando los correspondientes métodos de cuantificación, obteniendo así las respectivas curvas de calibración.

Ensayo de Precisión

La precisión es una medida del grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando un método se lleva a cabo en las mismas condiciones experimentales. Se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados (desviación estándar o desviación estándar relativa) (Eurolab, 2016).

Para este ensayo se prepararon soluciones testigos que fueron analizadas con los respectivos métodos de cuantificación. Para los métodos de cuantificación de glucosa y azúcares reductores se utilizó una solución testigo de glucosa de 1,5 g/L de concentración (Merck, lote: k46890337). Se

analizaron 20 réplicas de la solución testigo en dos días diferentes (10 réplicas por día), aplicando las correspondientes curvas de calibración realizadas a partir de cada estándar.

Ensayo de Veracidad

La veracidad es una expresión de la proximidad de la media de un número de resultados a un valor de referencia dado (Eurolab, 2016).

Para este ensayo se prepararon por quintuplicado soluciones de concentración conocida de glucosa empleando como solvente al medio de cultivo (matriz) a utilizar. Luego se analizaron las soluciones con el método de cuantificación correspondiente aplicando la curva de calibración realizada con el respectivo estándar, en pos de determinar el porcentaje de recuperación de cada analito. Para los métodos de cuantificación de glucosa y azúcares reductores se prepararon soluciones de glucosa de 1,5 g/L de concentración (Merck, lote: k46890337). Las soluciones fueron preparadas en medio YP (extracto de levadura 10 g/L, peptona de carne 20 g/L) y en el medio de cultivo alternativo (8,25 g/L de sulfato de amonio, 2,5 g/L de cloruro de potasio, 0,85 g/L fosfato de monoamónico, 0,3 g/L de sulfato de magnesio, 2,5 ml/L de ácido fosfórico, 1 ml/L de hidróxido de amonio) en este caso sin el agregado de melaza de caña.

Evaluación de los resultados de la validación

Para la evaluación de los resultados de la validación de los diferentes métodos de cuantificación se realizaron los siguientes análisis estadísticos.

Primeramente, para el ensayo de Linealidad se calculó el coeficiente de correlación correspondiente a un modelo de ajuste lineal indicado en la **Figura 5**, a fin de 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. Así también, se analizó la homocedasticidad de los residuos para comprobar la aleatoriedad de la absorbancia medida a través del cambio de la concentración evaluada (**Figura 6**) (Eurolab, 2016).

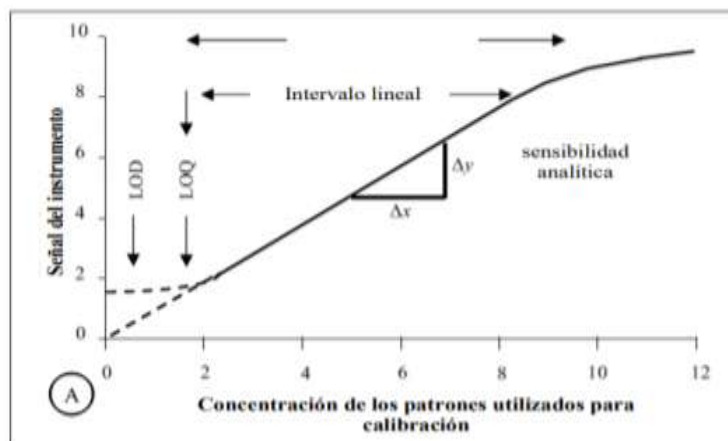


Figura 5: Esquema de un modelo de ajuste lineal: Curva de respuesta obtenida por ensayos espectrofotométricos, los cuales aplican a la ley de Lambert-Beer que presenta una relación lineal entre la concentración del analito en la muestra y la absorbancia de esta. El rango lineal se establece entre el límite de cuantificación (LOQ) y la concentración a la cual la absorbancia comienza a saturar (Eurolab, 2016).

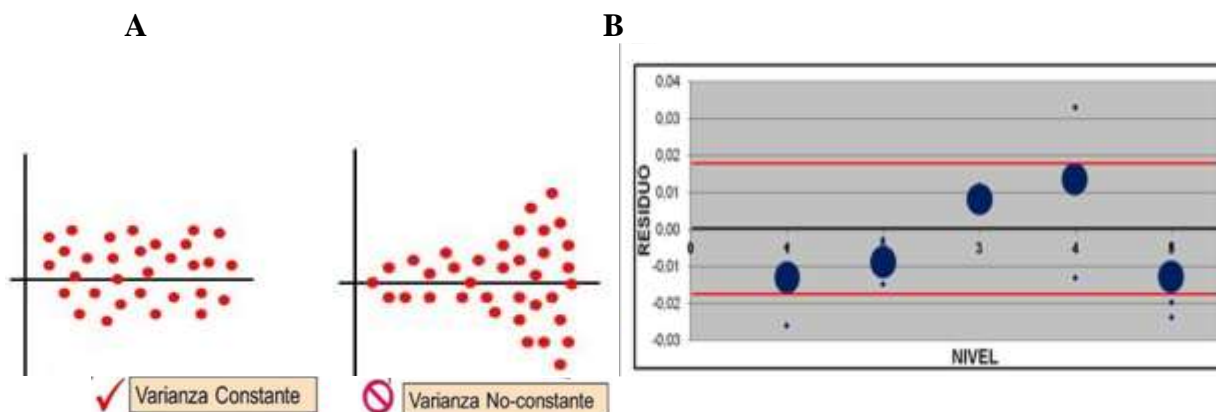


Figura 6: Esquema de la distribución de residuos. A) Representación esquemática del análisis de la homocedasticidad de los residuos. Con la homocedasticidad se evalúa si la varianza entre el valor predicho y el observado es o no constante a lo largo de las observaciones. B) Ejemplo de cómo se observaría 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**.

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

Dónde:

S es la desviación estándar entre las mediciones.

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

De acuerdo con las concentraciones de trabajo (C) utilizadas se estableció un criterio de RSD% menor a 5 % entre los 20 replicados realizados (**Figura 5**), este valor se calculó aplicando la ecuación de Horwitz (**Ecuación 2**).

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

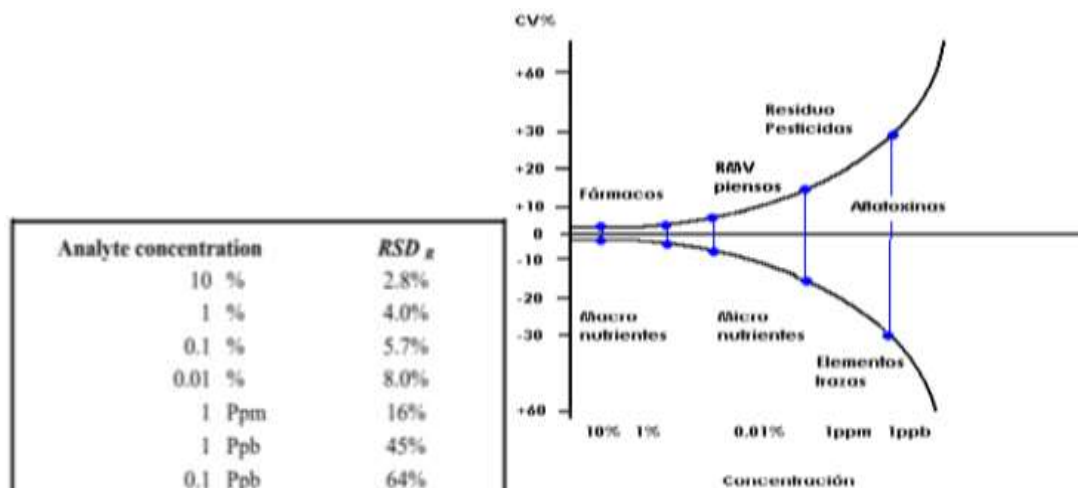


Figura 7: Variación esperada según la concentración de analito evaluada. La tabla muestra valores de desviación estándar residual porcentual a partir de la ecuación de Horwitz para diferentes concentraciones de analito. El gráfico corresponde a la curva original de Horwitz Horn la cual muestra la dependencia de la dispersión en relación con la concentración de analito analizada (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

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 20 determinaciones realizadas.

Con estos valores se calcularon los límites de alarma ($\bar{X} \pm 2S$) y los límites de control ($\bar{X} \pm 3S$) correspondientes a una distribución normal (**Figura 6**).

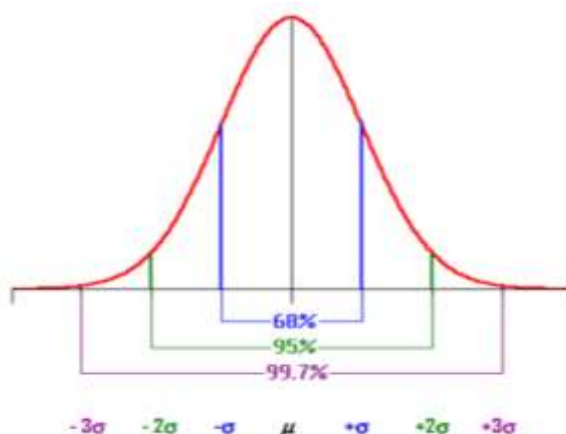


Figura 8: Distribución normal de valor medio (Campana de Gauss). Se muestra la probabilidad de que un valor (X_o) se ubique en los intervalos comprendidos por la desviación estándar (S). En un gráfico de control de valor medio se espera que el 95 % de los resultados se encuentre dentro de los límites de alarma (LA = $\pm 2S$) y el 99,7 % dentro de los límites de control (LC = $\pm 3S$).

Finalmente, para el ensayo de Veracidad (**Figura 9**) 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 %.

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

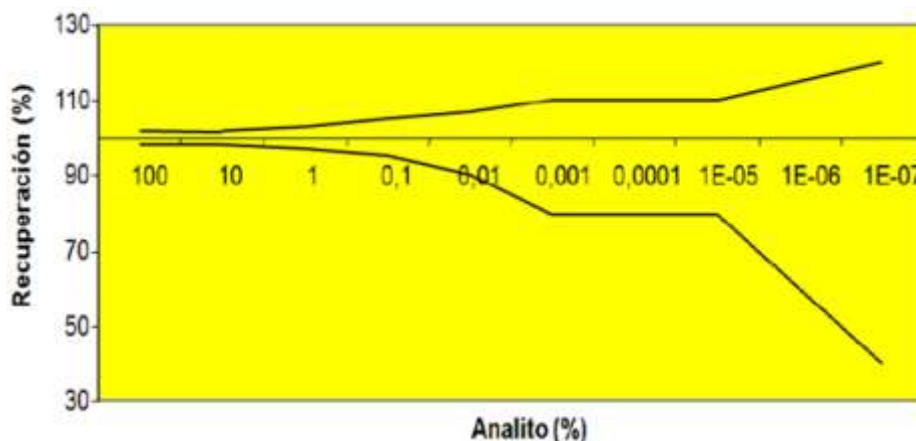


Figura 9: Recuperación esperada según la concentración de analito evaluada. El gráfico muestra la dependencia del porcentaje de recuperación con la concentración de analito analizada.

3.1.1 Cuantificación enzimática de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó mediante el método enzimático de glucosa oxidasa/peroxidasa, que consiste en dos reacciones acopladas catalizadas por las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa que convierten la glucosa en quinoneimina, compuesto que absorbe a una longitud de onda de 500 nm (Trinder, 1969). La Figura 8 detalla las reacciones correspondientes al método enzimático de cuantificación de glucosa.

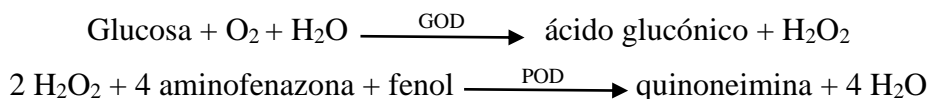


Figura 10: Esquema de las reacciones indicando cómo se genera, a partir de glucosa, el compuesto coloreado medible espectrofotométricamente a 500 nm.

Para la cuantificación de glucosa se utilizó el reactivo enzimático provisto por el kit comercial de glicemia enzimática de *Human*. Para tal fin, a partir de una solución *stock* de 4 g/L de glucosa (Anedra, lote: 28910-1) se realizaron diluciones seriadas al medio para obtener los siguientes 5

puntos de calibración: 0,25 g/L; 0,5 g/L; 1 g/L; 2 g/L y 4 g/L. Asimismo, se preparó una solución testigo de glucosa 1,5 g/L de concentración (Merck, lote: k46890337). 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.

Siguiendo la indicación del kit comercial, en tubos de ensayo de vidrio se colocaron 10 μ l de las soluciones preparadas con anterioridad y se agregó 1 ml del reactivo provisto por el kit, luego se homogeneizó. Seguidamente se incubó a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S. Las muestras y estándares se analizaron como mínimo por duplicado. La **Figura 11** muestra las soluciones luego de las reacciones de este método para 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. Asimismo, para otorgar validez al ensayo, se construyó un gráfico de control de valor medio utilizando los valores obtenidos con el ensayo de Precisión.



Figura 11: 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 (solución testigo de glucosa 1,5 g/L).

3.1.2 Cuantificación de azúcares reductores totales

La cuantificación de los azúcares reductores se realizó mediante el ensayo colorimétrico que utiliza ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), este es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, desarrollándose un cambio de color con variaciones de amarillo hasta café. El cambio de coloración es medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm (Ávila, *et. al.*, 2012). En la **Figura 12** se detalla la reacción correspondiente al método de cuantificación de azúcares reductores.

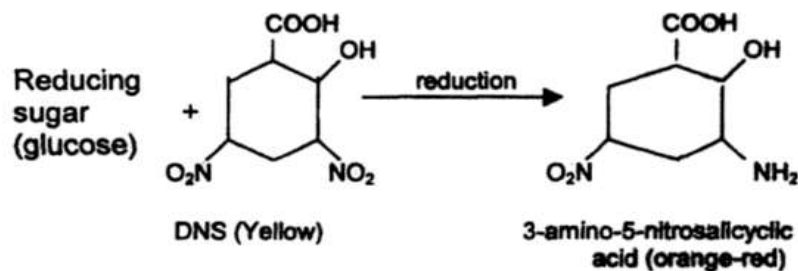


Figura 12: Esquema de la reacción del método de cuantificación de azúcares reductores. Reacción de reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitro salicílico (compuesto de color naranja-rojizo) en presencia de azúcares reductores.

Primeramente, se prepararon por triplicado 5 concentraciones del estándar de tal manera de abarcar el rango lineal de absorbancia del espectrofotómetro. 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 glucosa (Anedra, lote 28910-1). Asimismo, se preparó una solución testigo de glucosa de 1,5 g/L de concentración (Merck, lote: k46890337). Además, se preparó un blanco correspondiente a la matriz analizada, sin azúcares. También se utilizó agua destilada como blanco de los estándares y del testigo.

Para la preparación del reactivo de DNS: Se pesó 1 g de 3,5-ácido dinitrosalicílico, 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1,6 g de hidróxido de sodio. Se disolvió el hidróxido de sodio en 40 ml de agua destilada y se añadió lentamente el tartrato de sodio y potasio en agitación. Se completó con agua destilada hasta 80 ml y se agregó lentamente el 3,5-ácido dinitrosalicílico. Se dejó en agitación toda la noche, se enrazó a 100 ml y se filtró con papel de filtro cualitativo (Ávila, *et. al.*, 2012).

Para el ensayo se mezclaron 0,5 ml de cada solución estándar o muestra y 0,5 ml del reactivo de DNS en tubos de ensayo. Se llevaron los tubos a ebullición en baño con agua durante 5 min y luego se enfriaron en hielo. Se añadieron 5 ml de agua destilada y se dejó reposar por 15 min. Se determinó la absorbancia por espectrofotometría a 540 nm (Ávila, *et. al.*, 2012).

En la **Figura 13** se observan las soluciones luego de las reacciones para las distintas concentraciones de los estándares, testigo y blanco de reacción. Las muestras y estándares se analizaron como mínimo por duplicado. La puesta a punto y validación de esta metodología se realizó aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad descritos 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.

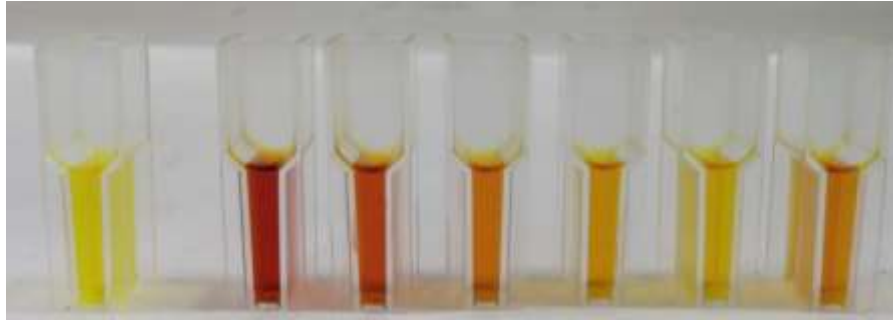


Figura 13: Soluciones correspondientes al método de cuantificación de azúcares reductores. Se muestran las soluciones luego de la reacción de reducción a partir de la cual se genera ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color naranja-rojizo). BCO, corresponde al blanco de reacción (agua); ST, corresponden a los niveles de calibración (diferentes concentraciones de estándar); MC, corresponde a la muestra control (solución testigo de glucosa 1,5 g/L).

3.2 Microorganismos

Se utilizaron dos tipos de cepas comerciales de levaduras deshidratadas empleadas en la elaboración de cerveza: la cepa SafAle US-05, la cual es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada para elaboración de cerveza tipo Ale de la marca Fermentis y la cepa SafLager S-23, la cual es una cepa de *Saccharomyces pastorianus* empleada para elaboración de cerveza tipo Lager, también de la marca Fermentis. Tanto la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* como la de *Saccharomyces pastorianus* se rehidrataron siguiendo las indicaciones del proveedor, inoculándose en una proporción 1:10 en medio líquido YPD contenido en frascos *Erlenmeyer*. Luego los frascos se incubaron a 30°C por 24 h a 200 rpm en un *thermoshaker* marca Gerhardt. Posteriormente, se realizaron *stocks* de ambas cepas en glicerol a 20 % v/v final, para su conservación a -80°C.

3.3 Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*

Se realizaron curvas de calibración entre la densidad óptica (DO_{600}) y el peso seco de biomasa para las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*, empleando la misma metodología para ambas levaduras.

Para tal fin, *stocks* en glicerol de cada cepa se sembraron en 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) y se incubaron a 30°C por 48 h. A partir de la biomasa crecida en dichas 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 *thermoshaker* durante 40 h a 30°C y 200 rpm. A partir de la biomasa de los cultivos líquidos se realizaron diluciones seriadas con agua destilada estéril, a las cuales se les determinó la densidad óptica midiendo la absorbancia a 600 nm (DO_{600}) por espectrofotometría. Asimismo, alícuotas de 5 ml de

cada dilución se centrifugaron en una centrifuga *Eppendorf* HERMLE Z216 a 5000 rpm durante 20 min. Luego, se descartaron los sobrenadantes y los precipitados celulares se llevaron a sequedad total en una estufa FANEM 520 a 60°C hasta peso constante. Se determinó el peso seco de la biomasa expresado en g/L para cada dilución analizada. 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) para ambas levaduras.

3.4 Medio de cultivo a base de melaza de caña

La melaza de caña de la composición del medio de cultivo alternativo utilizado para el crecimiento de las cepas de levaduras se obtuvo de manera comercial. La composición del medio de cultivo fue la siguiente: 41,4 ml/L de melaza de caña, 8,25 g/L de sulfato de amonio, 2,5 g/L de cloruro de potasio, 0,85 g/L fosfato de monoamónico, 0,3 g/L de sulfato de magnesio, 2,5 ml/L de ácido fosfórico y 1 ml/L de hidróxido de amonio.

Para la utilización de dicho medio de cultivo en los ensayos de crecimiento de las levaduras se evaluaron los siguientes tratamientos de esterilización, para los cuales se utilizó la misma formulación del mencionado medio.

Tratamientos de esterilización del medio de cultivo a base de melaza de caña

Para el primer tratamiento de esterilización evaluado, se disolvieron 41,4 ml de melaza de caña en 1 L de agua destilada estéril y posteriormente se agregaron las sales mencionadas. Se midió el pH del medio y se ajustó con hidróxido de sodio (NaOH) 5 N a un pH de 6. Finalmente se esterilizó a 121°C, a 1 atm por 15 min, en autoclave vertical marca Boyn LDZX-30KBS. El medio se incubó a 30°C por 48 h en una incubadora. Se realizó la tinción de Gram luego de cumplido el tiempo de incubación y se observó el medio de cultivo al microscopio óptico *Zeiss* a 40x.

Para el segundo tratamiento de esterilización evaluado, se disolvieron 41,4 ml de melaza de caña en 1 L de agua destilada estéril, se procedió a su clarificado en una centrífuga Boyn TLG-16M mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min y luego se agregaron las sales mencionadas. Asimismo, se midió el pH del medio de cultivo y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C, a 1 atm por 20 min. Al finalizar el autoclavado se ajustó el pH a 6 con hidróxido de potasio (KOH) 10% estéril. El medio se incubó a 30°C por 48 h en incubadora. Se observó el medio en un preparado al microscopio óptico *Zeiss* a 40x. Se inoculó en agar LB y se incubó por 48 h a 30°C.

3.5 Evaluación del crecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD

Con el fin de evaluar el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en un medio rico a escala *Erlenmeyer* se realizaron cultivos de ambas levaduras en el medio YPD. Primeramente, a partir de stocks de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* se sembraron placas de Petri con YPD agar y las mismas se incubaron a 30°C por 48 h. Luego a partir de biomasa crecida en ambas placas se inocularon frascos *Erlenmeyer* de 100 ml conteniendo 20 ml de medio YPD y los frascos se incubaron a 30°C y 200 rpm por 48 h en *thermoshaker*. Luego del tiempo de incubación se determinó la densidad óptica de los cultivos mediante absorbancia a 600 nm (DO_{600}) por espectrofotometría.

Dichos cultivos fueron utilizados para inocular en una relación 1:10 frascos *Erlenmeyer* de 250 ml conteniendo 50 ml de YPD. Los frascos fueron incubados a 30°C y 200 rpm en *thermoshaker*. Los cultivos se realizaron por duplicado para ambas cepas de levaduras. Se tomaron muestras de los cultivos periódicamente para evaluar su crecimiento por medio de la determinación de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), así como también para evaluar el consumo de glucosa y azúcares reductores mediante espectrofotometría.

A partir de estos cultivos se determinaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de ambas cepas en medio YPD: velocidad específica de crecimiento (μ), 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 ($P_{v \text{ Max}}$).

3.6 Evaluación del crecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio alternativo a base de melaza de caña

Con el fin de evaluar la capacidad de producir biomasa líquida de levadura en un medio de cultivo económico, se analizó el crecimiento a escala *Erlenmeyer* de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en el medio alternativo a base de melaza de caña, y así realizar una comparación con el crecimiento en el medio rico YPD.

Para tal fin, inicialmente a partir de *stocks* tanto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* se sembraron placas de *Petri* conteniendo medio a base de melaza de caña con agar y las mismas se incubaron a 30°C por 48 h. Luego a partir de la biomasa crecida en ambas placas se inocularon frascos *Erlenmeyer* de 100 ml conteniendo 20 ml de medio a base de melaza de caña. Los frascos se incubaron a 30°C y 200 rpm por 48 h en *thermoshaker*. Luego del tiempo de incubación se determinó la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) mediante espectrofotometría.

Dichos cultivos fueron utilizados para inocular en una relación 1:10 frascos *Erlenmeyer* de 250 ml conteniendo 50 ml del medio a base de melaza de caña. Los frascos fueron incubados a 30°C

y 200 rpm en *thermoshaker*. Los cultivos se realizaron por duplicado para ambas cepas de levaduras. Se tomaron muestras de los cultivos periódicamente para evaluar su crecimiento por medio de la determinación de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), así como también para evaluar el consumo de glucosa y azúcares reductores mediante espectrofotometría.

A partir de estos cultivos se determinaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de cada cepa en dicho medio de cultivo: velocidad específica de crecimiento (μ), 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 ($P_{v \text{ Max}}$).

3.7 Escalado de la producción de biomasa líquida de levadura en biorreactor de tanque agitado

El escalado de la producción de biomasa de la cepa SafAle US-05 de *Saccharomyces cerevisiae* y de la cepa SafLager S-23 de *Saccharomyces pastorianus*, se realizó mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado de escala laboratorio. Inicialmente, se realizaron fermentaciones con medio de cultivo YPD y luego se procedió a realizar las fermentaciones utilizando el medio alternativo a base de melaza de caña. Todas las fermentaciones se realizaron en un biorreactor de tanque agitado de 2 litros (BioFlo 120) de *Eppendorf*, el cual se muestra en la **Figura 14**.



Figura 14: Biorreactor de tanque agitado de 2 litros (Bioflo 120) de *Eppendorf* en funcionamiento.

Para llevar a cabo las fermentaciones en biorreactor se partió de cultivos de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* realizados en *Erlenmeyer* de 1 L conteniendo 150 ml de YPD o medio de cultivo a base de melaza de caña, los cuales se incubaron

durante 24 h en un *shaker* orbital a 30°C y 200 rpm. Estos cultivos se utilizaron para la inoculación del biorreactor conteniendo 1,5 L de medio y así se iniciaron las fermentaciones bajo las condiciones óptimas. El biorreactor mencionado permite controlar de modo *on-line* los distintos parámetros del proceso fermentativo. Así, el control 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 biorreactor permitió controlar la temperatura y mantener constante su valor óptimo. La formación de espuma se evitó mediante la adición de aceite de maíz 3 ml/L al medio de cultivo, previa esterilización.

Mediante el programa *Eppendorf Bioprocess Control Software (BCS)* se registraron de modo *on-line* los siguientes parámetros de los procesos fermentativos: agitación (rpm), oxígeno disuelto (% O₂d), pH, temperatura y porcentaje de alimentación con medio de cultivo concentrado (% bomba de alimentación).

La producción de biomasa mediante fermentaciones en biorreactor fue evaluada aplicando un sistema de cultivo alimentado o *Fed-Batch*. Para tal fin se realizó una primera etapa de cultivo en lote o *Batch* y una posterior etapa de cultivo alimentado con flujo de alimentación constante y con medio de cultivo conteniendo la fuente de carbono concentrada 10X. Así, para las fermentaciones realizadas en YPD, la alimentación se efectuó con medio YPD con una concentración de glucosa de 200 g/L. Por otro lado, para las fermentaciones realizadas en medio alternativo, la alimentación se realizó con una solución de melaza de caña con una concentración de 414 ml/L.

A distintos tiempos de fermentación se tomaron muestras para determinar el nivel de biomasa y cuantificar las concentraciones de glucosa y azúcares reductores mediante los métodos colorimétricos y enzimáticos descriptos. Estas cuantificaciones se realizaron a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. A partir de los resultados de las muestras analizadas se determinaron los valores de rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido ($Y_{X/S}$), máxima cantidad de biomasa producida (X_{max}), productividades volumétricas de biomasa (P_v) y productividad volumétrica máxima de biomasa ($P_{v Max}$).

En la **Tabla 1** se resumen las condiciones de operación aplicadas durante la etapa *Batch* de las fermentaciones realizadas en biorreactor agitado con los medios YPD y medio de cultivo a base de melaza de caña; mientras que en la Tabla 2 se resumen las condiciones de operación aplicadas para las fermentaciones en la etapa *Fed-Batch*.

Tabla 1: Condiciones de operación en la etapa *Batch* de las fermentaciones realizadas en biorreactor de tanque agitado con los medios YPD y medio alternativo a base de melaza de caña.

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

Tabla 2: Condiciones de operación en la etapa *Fed-Batch* de las fermentaciones realizadas en biorreactor de tanque agitado con los medios YPD y medio alternativo a base de melaza de caña.

Condiciones	
Temperatura (°C)	30
pH	5,5
Agitación (RPM)	200 – 900
Aireación (LPM)	0,2 – 1,4
Ácido	HCl 3 M
Base	NaOH 3M

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación

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

4.1.1. 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 (**Figura 15A**). La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue $y = 0,4081x - 0,0568$ con un valor de R^2 igual a 0,9957, por lo cual podemos inferir que el ensayo se ajusta correctamente al modelo lineal (R^2 mayor o igual a 0,995) en el rango de absorbancia de trabajo. Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel medido el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (**Figura 15B**), en el cual no se observa tendencia de los residuos a través del cambio de la concentración del analito.

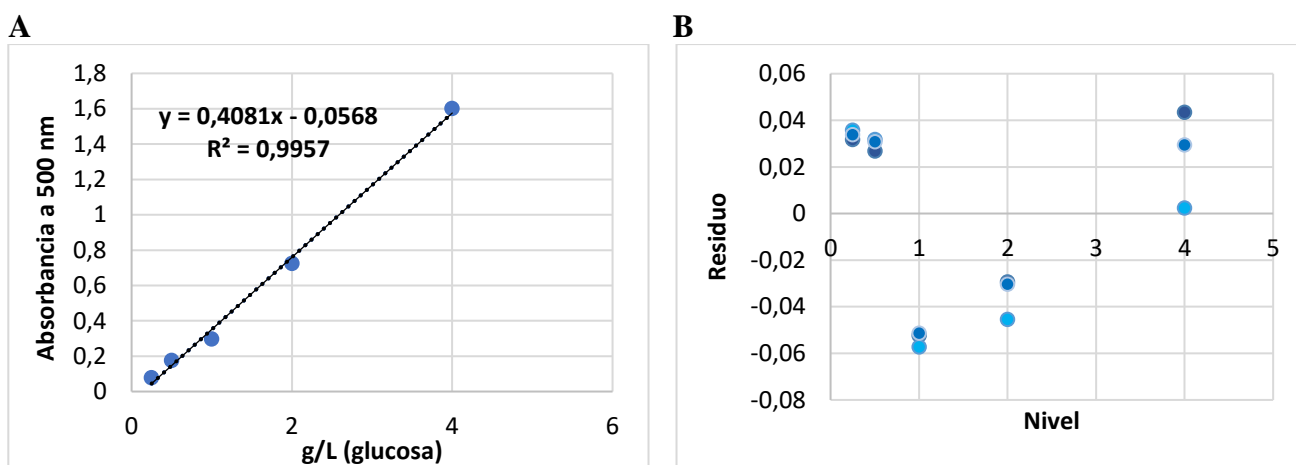


Figura 15: Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de glucosa. A) Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de glucosa. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 0,4081x - 0,0568$ con un R^2 de 0,9957. **B)** Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

Por otro lado, mediante el ensayo de Precisión se analizaron 20 réplicas de un testigo de glucosa (1,5 g/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 1,60 g/L de glucosa con un desvío estándar de 0,046 g/L y un RSD% de 2,88 %, estos resultados muestran una reducida dispersión con valores de RSD% menores al 5 % y una aceptable repetibilidad.

Con estos resultados se construyó el gráfico de control de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (**Figura 16**). Como se observa en dicho gráfico todos los valores obtenidos para el testigo analizado 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). Por lo tanto, los resultados obtenidos para los ensayos realizados fueron confiables.

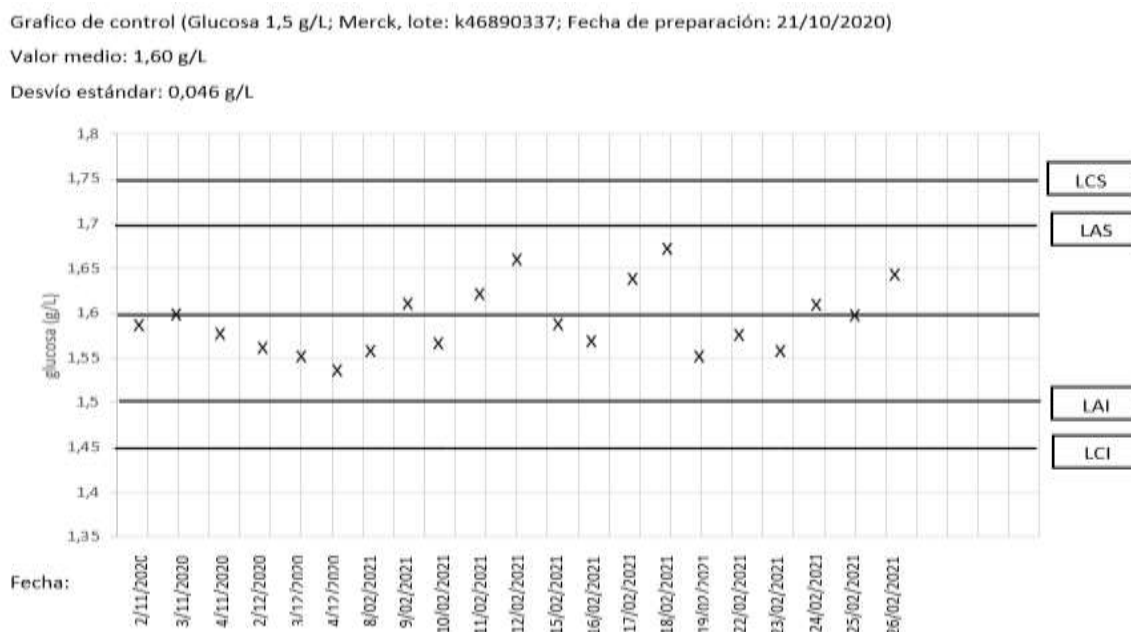


Figura 16: Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de glucosa. En el gráfico se indican los resultados obtenidos a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de glucosa de 1,5 g/L) en cada fecha en el que se realizó el método de cuantificación de 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 complejo YP fue 100,5 % con un RSD% de 1,67%; asimismo, se logró determinar que el porcentaje de recuperación del testigo de glucosa preparado en medio a base melaza de caña fue 99 % con un RSD% de 4,13 %; De esta manera, se consiguió un valor de recuperación del analito en la matriz dentro del rango esperado tanto para el medio YPD como para el medio a base de melaza de caña, lo que indica que el método de cuantificación de glucosa no presenta un sesgo significativo.

4.1.2. Método de cuantificación de azúcares reductores totales

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 (**Figura 17A**). La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue

$y = 0,5842x + 0,0314$ con un valor de R^2 igual a 0,9995, por lo cual podemos inferir que el ensayo se ajusta correctamente al modelo lineal (R^2 mayor o igual a 0,995) en el rango de absorbancia de trabajo. Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel medido el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (**Figura 17B**), en el cual no se observa tendencia de los residuos a través del cambio de la concentración del analito.

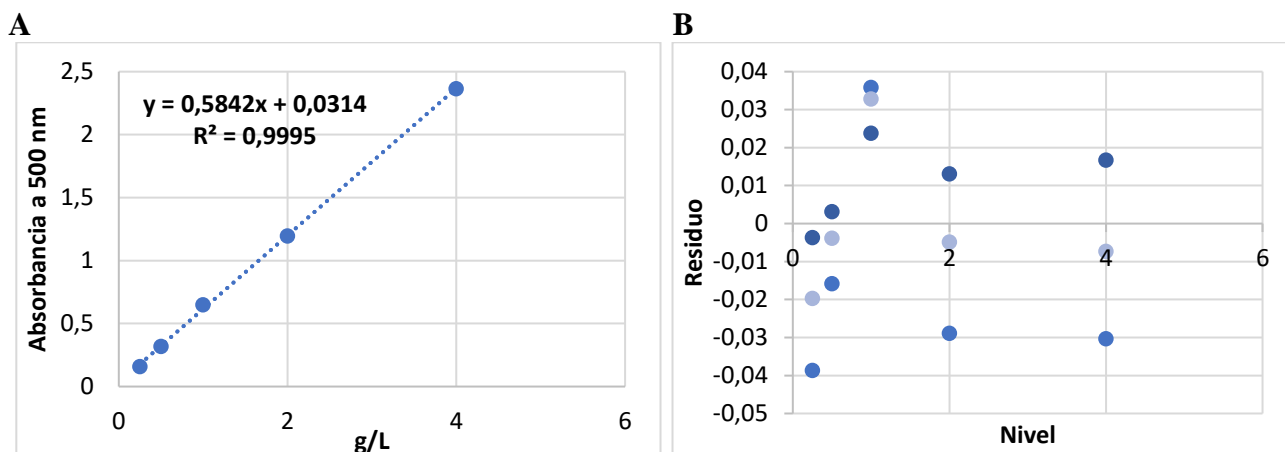


Figura 17: Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores. A) Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 0,5842x + 0,0314$ con un R^2 de 0,9995. **B)** Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

Por otro lado, mediante el ensayo de Precisión se analizaron 20 réplicas de un testigo de glucosa (1,5 g/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 1,47 g/L de glucosa con un desvío estándar de 0,03 g/L y un RSD% de 1,78 %, estos resultados muestran una reducida dispersión con valores de RSD% menores al 5 % y una aceptable repetibilidad. Con estos resultados se construyó el gráfico de control de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (**Figura 18**). Como se observa en dicho gráfico todos los valores obtenidos para el testigo analizado 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). Por lo tanto, los resultados obtenidos para los ensayos realizados fueron confiables.

Gráfico de control (Glucosa 1,5 g/L; Merck, lote: k46890337; Fecha de preparación: 21/10/2020)

Valor medio: 1,47 g/L

Desvío estándar: 0,03 g/L

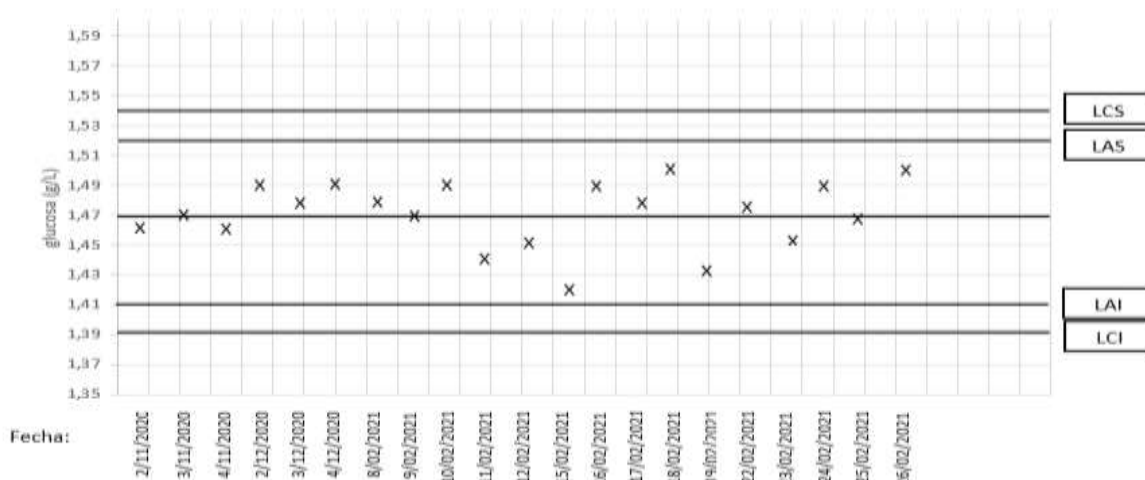


Figura 18: Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de azúcares reductores. En el gráfico se indican los resultados obtenidos a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de glucosa de 1,5 g/L) en cada fecha en el que se realizó el método de cuantificación de azúcares reductores. LAS, límite de alarma superior; LAI, límite de alarma inferior; LCA, límite de control superior; LCI, límite de control inferior.

Además, aplicando el ensayo de Veracidad se logró determinar que el porcentaje de recuperación del testigo de glucosa preparado en medio complejo YP fue 104 % con un RSD% de 0,79 %; asimismo, se logró determinar que el porcentaje de recuperación del testigo de glucosa preparado en medio a base melaza de caña fue 99 % con un RSD% de 1,25 %; De esta manera, se consiguió un valor de recuperación del analito en las diferentes matrices dentro del rango esperado, lo que indica que el método de cuantificación de azúcares reductores no presenta un 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 ($R2 \geq 0,995$)	0,9957		0,9995
Precisión ($RSD\% < 5\%$)	2,87 %		1,78 %	
Veracidad ($95\% < \% \text{ recuperación} < 105\%$)	En Medio YPD	En Medio a base de Melaza de caña	En Medio YPD	En Medio a base de Melaza de caña
	100,5 %	99 %	104 %	99 %

Se puede asegurar que las metodologías utilizadas poseen una apropiada exactitud, ya que los métodos de cuantificación presentaron una adecuada precisión y veracidad. Estos resultados sumados

a los obtenidos a partir de los ensayos de Linealidad establecieron que las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores fueron aptas para su aplicación. De este modo con las metodologías de cuantificación puestas a punto y validadas, se dispuso de herramientas confiables para el análisis del proceso de producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*, además se establecieron controles de los resultados aplicando los gráficos de control de valor medio para cada método.

4.2. Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*

Se cuantificó el peso de los precipitados secos de *Saccharomyces cerevisiae* crecido en medio líquido YPD y se graficó la curva de calibración de DO₆₀₀ vs el peso seco de biomasa (g/L) (**Figura 19**). A partir del ajuste lineal de la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta $y = 1,4272x$ con un R^2 de 0,9992. De este modo se logró relacionar la densidad óptica celular con el peso seco de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

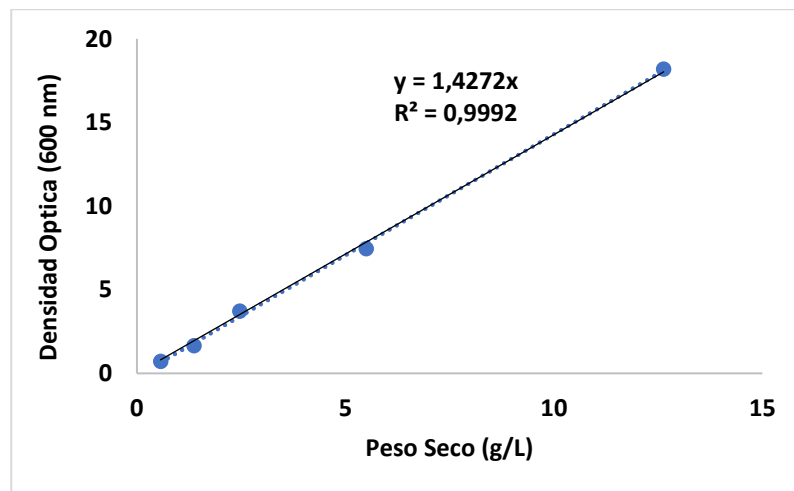


Figura 19: Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de *Saccharomyces cerevisiae*. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 1,4272x$ con un R^2 de 0,9992.

La **Ecuación 4**, derivada de la ecuación de la recta, se utilizó para determinar valores de peso seco de biomasa en g/L a partir de valores de densidad óptica medidos a 600 nm de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, considerando el blanco del medio de cultivo.

$$\text{Ecuación 4} \qquad \text{Biomasa (g/L): } \frac{\text{D.O. (600nm)}}{1,4272}$$

Del mismo modo, se cuantificó el peso de los precipitados secos de *Saccharomyces pastorianus* crecido en medio líquido YPD y se graficó la curva de calibración entre DO_{600} y el peso seco de biomasa (g/L) (**Figura 20**). A partir del ajuste lineal de la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta $y = 1,6398x$ con un R^2 de 0,9998. De este modo se logró relacionar la densidad óptica celular con el peso seco de biomasa de *Saccharomyces pastorianus*.

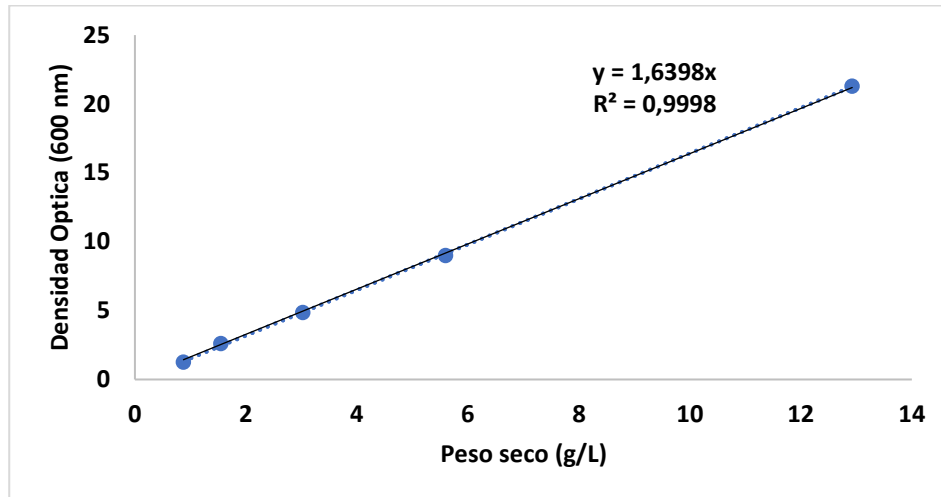


Figura 20: Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de *Saccharomyces pastorianus*. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta $y = 1,6398x$ con un R^2 de 0,9998.

La **Ecuación 5**, es derivada de la ecuación de la recta, se utilizó para determinar valores de peso seco de biomasa en g/L a partir de valores de densidad óptica medidos a 600 nm de cultivos de *Saccharomyces pastorianus*, considerando el blanco del medio de cultivo.

$$\text{Ecuación 5} \qquad \text{Biomasa (g/L): } \frac{D.O.(600nm)}{1,6398}$$

4.3. Medio de cultivo a base de melaza de caña

Antes de la primera prueba de esterilización del medio a base de melaza de caña, se midió el su valor de pH, dando un valor de 3,4. Debido a que el pH óptimo de crecimiento de levaduras cerveceras ronda en 5,4-5,6 se ajustó el pH del medio, para ello se utilizó hidróxido de potasio (KOH) al 10%. Posteriormente se realizó el proceso de esterilización a 121°C, 1 atm por 15 min, luego de este se observó turbidez en el medio de cultivo con una destacada cantidad de sedimento en el fondo del frasco. Por este motivo se llevó a cabo un examen en fresco con microscopio óptico a 40x en el que se observó diferentes elementos alargados y redondeados, los cuales podrían ser microorganismos que toleraron el proceso de esterilización, además de cristales (datos no mostrados).

A fin de determinar la presencia de microorganismos se realizó la incubación del medio de cultivo esterilizado. Luego de 48 h de incubación el medio de cultivo presentó mayor turbidez por lo que se procedió a realizar una tinción de Gram y posterior observación al microscopio óptico al 40x, en la que se observó bacilos cortos Gram positivos (**Figura 21**). Esto puede deberse a dos factores principales, primeramente, debido a que la melaza de caña es un desecho de la industria azucarera, lo cual implica el posible arrastre de impurezas y contaminaciones durante el proceso de producción del azúcar. Además, la melaza de caña es un compuesto rico en nutrientes, no solo en carbohidratos sino también en magnesio, calcio, fósforo y potasio. Estos componentes favorecen el crecimiento de bacterias como *Geobacillus stearothermophilus*, el cual es un bacilo esporulado resistente al tratamiento térmico primario y su presencia es habitual en la melaza cruda (Salem, *et. al.*, 2017).

A partir de la primera prueba de esterilización se concluyó que una sola esterilización es ineficiente para eliminar bacterias y/o sus esporas.

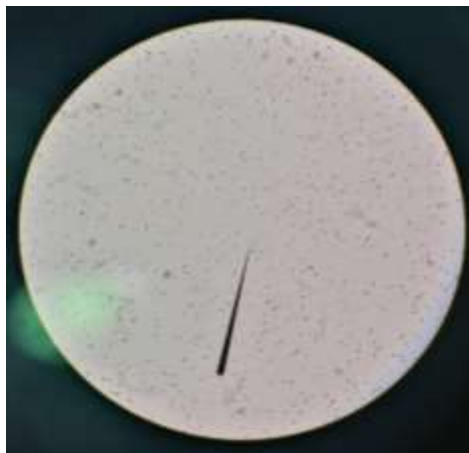


Figura 21: Tinción de Gram del medio de cultivo incubado visto al microscopio óptico con un aumento de 40x.

Para la segunda prueba de esterilización durante la elaboración del medio de cultivo a base de melaza de caña primeramente se disolvió la melaza en agua destilada estéril, y luego se centrifugó como se mencionó en Metodologías. La centrifugación se realizó a fin de eliminar impurezas y posibles contaminantes presentes (Fajardo y Sarmiento, 2007). Incluso, Cardozo y Moreno, 2012 a fin de eliminar los posibles contaminantes e impurezas realizaron 4 ciclos de centrifugado a 4000 rpm y posteriormente sometieron el clarificado a 3 ciclos de esterilización. Esto demuestra la necesidad de efectuar un tratamiento del medio a base de melaza de caña a fin de asegurar que el proceso de esterilización sea eficiente. Posterior al clarificado del medio de cultivo se observó diferencia de turbidez (**Figura 22**). Luego de efectuar la esterilización no se observó turbidez en el medio, así como tampoco se observó presencia de microorganismos en el examen microscópico. Asimismo, en este caso no se observó crecimiento microbiano en medio de cultivo LB agar (**Figura 23**). Por lo que

se puede concluir que el segundo tratamiento que incluye la centrifugación de la solución de melaza de caña y su posterior esterilización es el más adecuado para lograr eliminar los microorganismos contaminantes de la melaza de caña.



Figura 22: **Izquierda:** Melaza de caña diluida en agua destilada estéril luego de 1 (un) ciclo de centrifugado (melaza clarificada). **Derecha:** Melaza diluida en agua destilada estéril sin centrifugación.

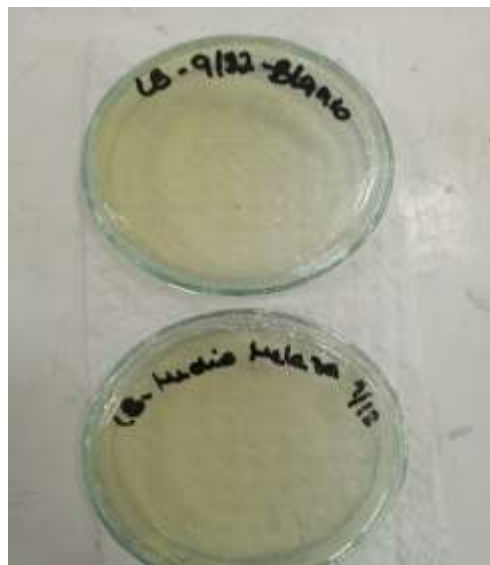


Figura 23: Agar LB inoculado con caldo melaza de caña clarificada posterior al autoclavado.

4.4. Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en el medio de cultivo YPD

Los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados a partir del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD a escala *Erlenmeyer*, fueron utilizados como valores de referencia para evaluar el crecimiento de dichas levaduras en el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.

4.4.1. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio complejo YPD

A partir de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en *Erlenmeyer* conteniendo medio YPD se evaluaron parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento como ser la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de sustratos glucosa y azúcares reductores (q_s) y el rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido ($Y_{x/s}$) y la productividad volumétrica (P_v). En la **Figura 24** se puede observar el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g_x/L), el consumo de azúcares reductores totales (g_s/L) y el consumo de glucosa (g_s/L) en función del tiempo de incubación (h). El consumo total de la glucosa (20,20 g_s/L), así como el consumo total de los azúcares reductores (25,06 g_s/L) ocurrió luego de 28 h de incubación. Así, a dicho tiempo se alcanzó un nivel máximo de biomasa de 16,57 g_x/L; lo que corresponde a un rendimiento de biomasa en función de glucosa consumida ($Y_{x/s}$) de 0,81 g_x/g_s y un rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$) de 0,67 g_x/g_s.

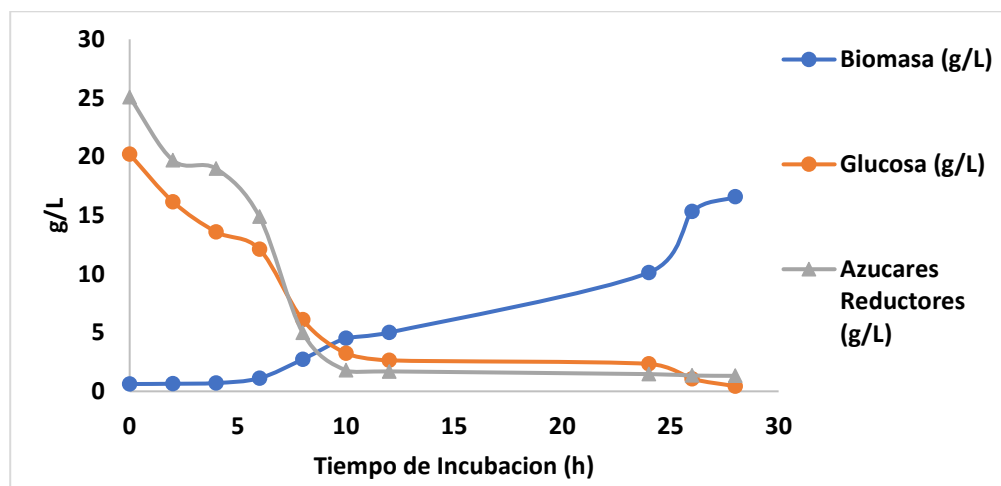


Figura 24: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores, todas estas en función del tiempo de incubación (h).

Aplicando logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento, para calcular la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) a través de la pendiente de la ecuación de la recta, determinándose que la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) presenta un valor de 0,35 h⁻¹ (**Figura 25**). Por otro lado, se calculó la velocidad específica de consumo de los diferentes sustratos analizados (glucosa y azúcares reductores) mediante la aplicación del logaritmo natural a las curvas de consumo de cada uno en función al tiempo de incubación (h). La pendiente de la ecuación de la recta obtenida mediante dicha linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo (r_s); para glucosa se obtuvo un r_s de 0,33 g_s/Lh, mientras que para azúcares reductores se obtuvo un r_s de 0,53 g_s/Lh (**Figura 26**). 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 la velocidad específica de consumo de glucosa igual a $0,07 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$, mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores fue $0,12 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$.

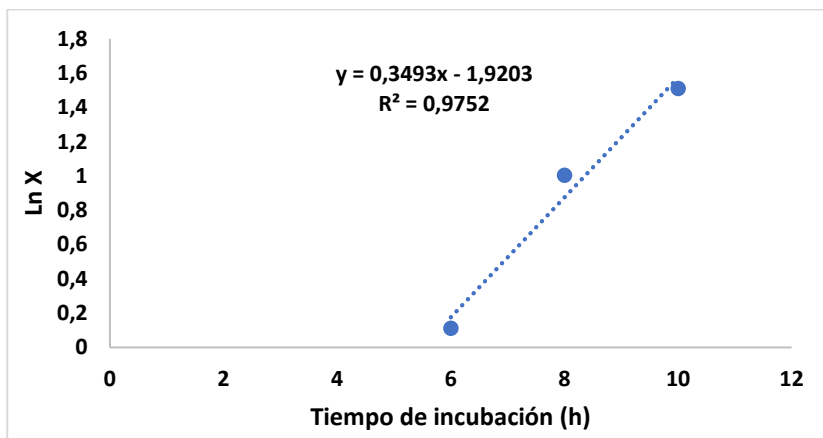


Figura 25: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD aplicando logaritmo natural. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = 0,3493x - 1,9203$ ($R^2 = 0,9752$) corresponde al valor de la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m).

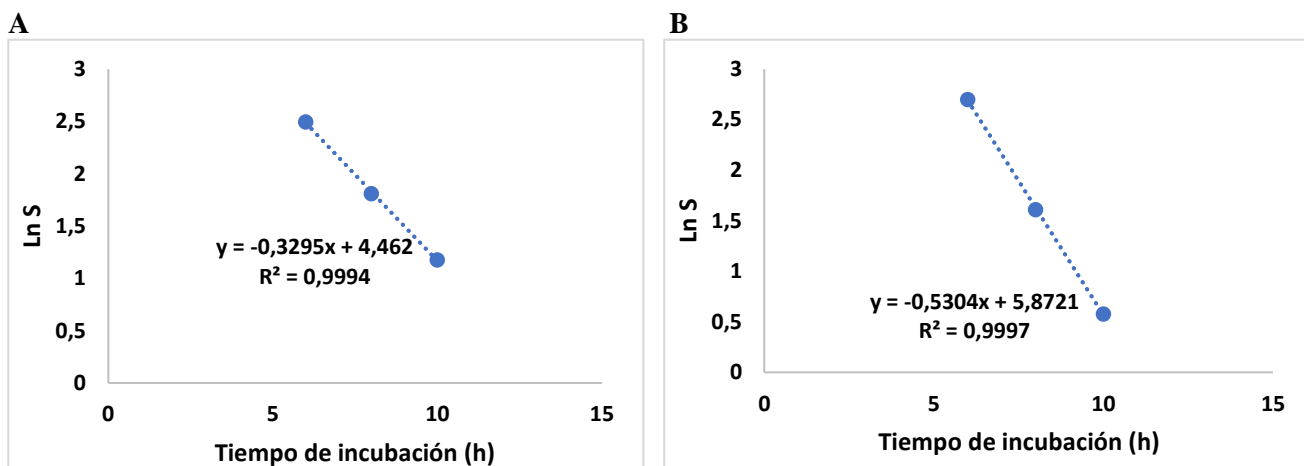


Figura 26: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD. **A) Linealización de la curva de consumo de glucosa:** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,3295x + 4,462$ ($R^2 = 0,9994$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de glucosa (r_s). **B) Linealización de la curva de consumo de azúcares reductores:** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,5304x + 5,8721$ ($R^2 = 0,9997$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores (r_s).

En la **Figura 27** se muestra la variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue $0,64 \text{ g/Lh}$, y se consiguió a las 2 h de incubación, mientras que la productividad volumétrica al final del cultivo (28 h de incubación) fue $0,51 \text{ g/Lh}$.

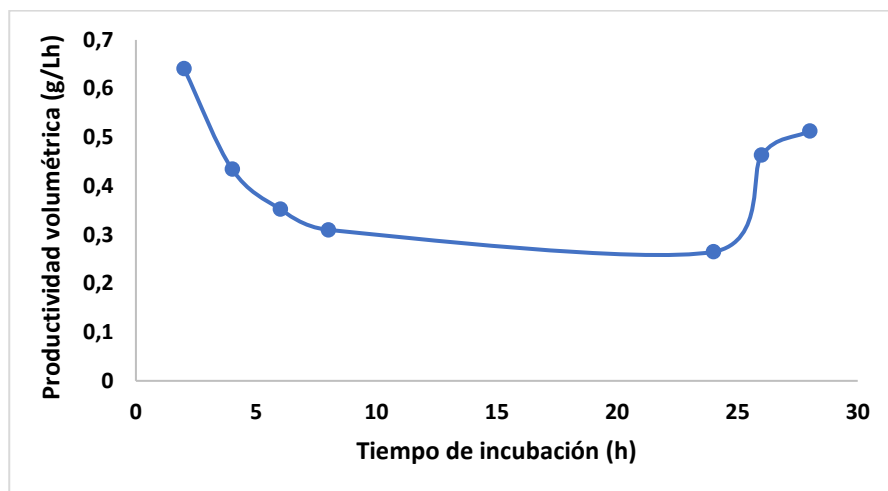


Figura 27: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD.

4.4.2. Crecimiento de *Saccharomyces pastorianus* en medio de cultivo YPD

A partir de cultivos de *Saccharomyces pastorianus* realizados en *Erlenmeyer* con medio YPD se evaluaron parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento como ser la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de sustrato (glucosa y azúcares reductores) (q_s) y el rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido ($Y_{x/s}$) y productividad volumétrica (P_v). En la **Figura 28** se puede observar el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g_x/L), el consumo de azúcares reductores totales (g_s/L) y el consumo de glucosa (g_s/L) en función del tiempo de incubación (h). El consumo total de glucosa (20,51 g_s/L), así como el consumo total de los azúcares reductores (27,26 g_s/L) ocurrió luego de 32 h de incubación, momento en el cual se alcanzó un nivel máximo de biomasa de 14,22 g_x/L , lo que corresponde a un rendimiento en base al consumo de glucosa ($Y_{x/s}$) de 0,67 g_x/g_s , así como también a un rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$) de 0,52 g_x/g_s .

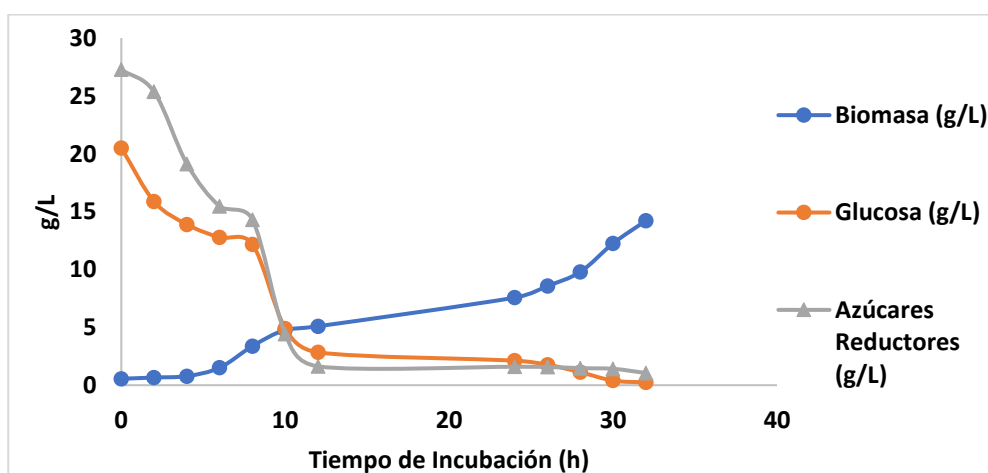


Figura 28: Cultivo de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores, todas estas en función del tiempo de incubación.

Aplicando logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento, para calcular la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) a través de la pendiente de la ecuación de la recta, determinando que dicha velocidad específica máxima presentó un valor de $0,37 \text{ h}^{-1}$ (**Figura 29**). Asimismo, se calculó la velocidad específica de consumo de los sustratos analizados (glucosa y azúcares reductores) mediante la aplicación del logaritmo natural a las curvas de consumo en función del tiempo de incubación. Las pendientes de las ecuaciones de la recta obtenidas mediante dicha linealización corresponden a las velocidades volumétricas de consumo (r_s). Para el consumo de glucosa se obtuvo un r_s de $0,03 \text{ g}_s/\text{Lh}$, mientras que para el consumo de azúcares reductores el r_s fue $0,07 \text{ g}_s/\text{Lh}$. Al dividir el valor de r_s por la biomasa producida en ese periodo se obtiene la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s). Así, la velocidad específica de consumo de glucosa fue $0,01 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$, y la velocidad específica de consumo de azúcares reductores fue $0,02 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$.

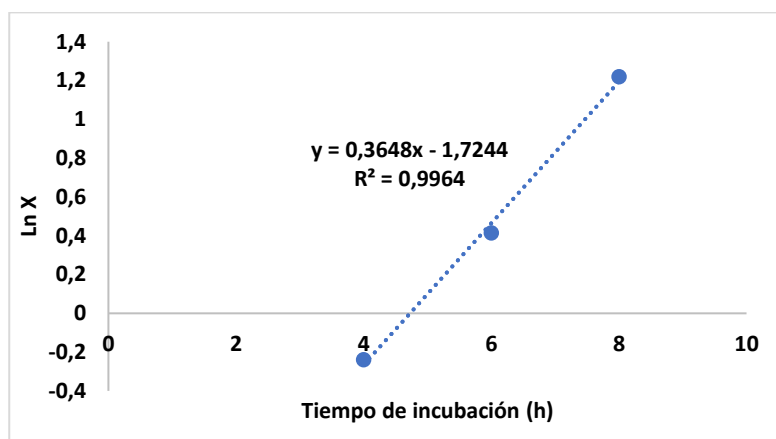
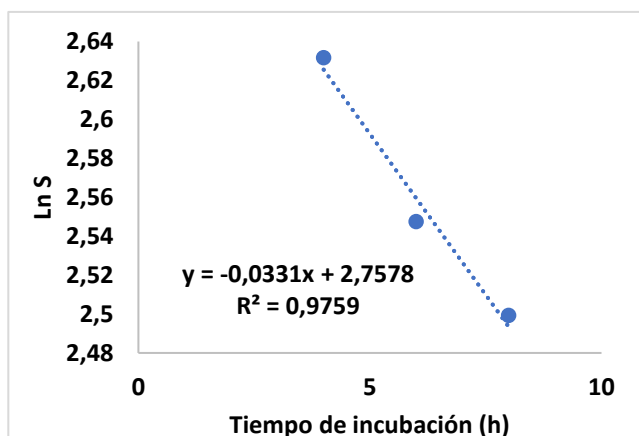


Figura 29: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD aplicando logaritmo natural. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = 0,3648x - 1,7244$ ($R^2 = 0,9964$) corresponde al valor de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m).

A



B

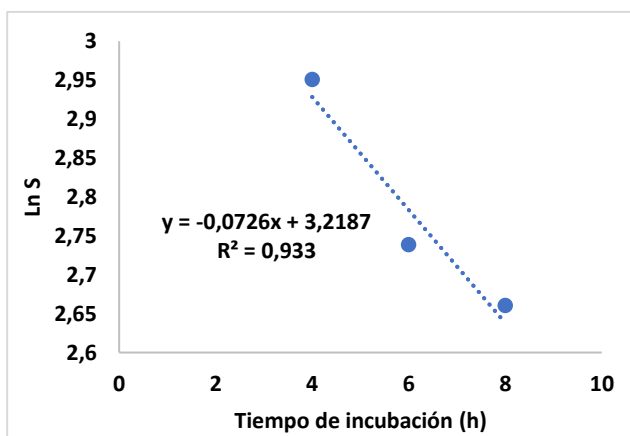


Figura 30: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD. **A) Linealización de la curva de consumo de glucosa:** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,0331x + 2,7578$ ($R^2 = 0,9759$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de glucosa (r_s). **B) Linealización de la curva de consumo de azúcares reductores:** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,0726x + 3,2187$ ($R^2 = 0,933$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores (r_s).

En la **Figura 31** se muestra la variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue 0,48 g/Lh, y se consiguió a las 10 h de incubación. Mientras que, la productividad volumétrica (P_v) de biomasa al final del cultivo (32 h de incubación) fue 0,44 g/Lh.

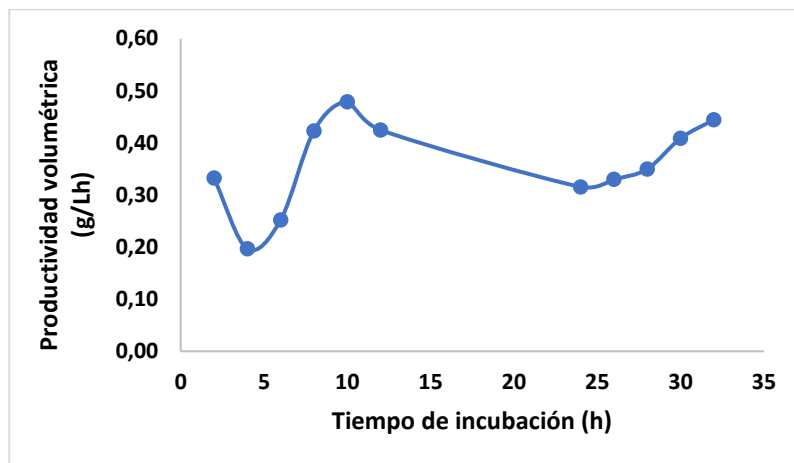


Figura 31: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD.

4.5. Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio de cultivo a base de melaza de caña

4.5.1. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio a base de melaza de caña

A partir de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio alternativo a base de melaza de caña se evaluaron parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento como ser la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de sustratos (q_s), el rendimiento de biomasa en función de los sustratos consumidos ($Y_{x/s}$), y la productividad volumétrica (P_v) de biomasa. En la **Figura 32** se puede observar el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g_x/L), el consumo de azúcares reductores totales (g_s/L) y el consumo de glucosa (g_s/L) en función del tiempo de incubación (h). El consumo total de glucosa (4,19 g_s/L) ocurrió a las 28 h, consiguiéndose en ese tiempo un nivel de biomasa de 7,15 g_x/L ; posteriormente se consumieron los azúcares reductores (36,73 g_s/L) luego de 52 h de cultivo alcanzando un nivel máximo de biomasa de 12,96 g_x/L , lo que corresponde a un rendimiento en función al consumo de azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$) de 0,34 g_x/g_s .

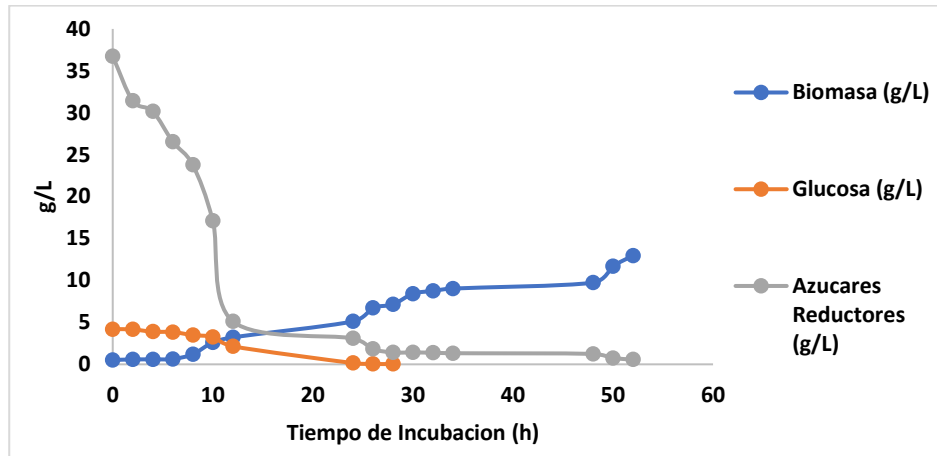


Figura 32: Cultivo de *S. cerevisiae* en medio a base melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g_x/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g_s/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g_s/L), en función del tiempo de incubación (h).

Aplicando logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento, para calcular la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) a través de la pendiente de la ecuación de la recta, determinándose que la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) presenta un valor de $0,36 \text{ h}^{-1}$, con azúcares reductores como principal fuente de carbono. Del mismo modo, se calculó la velocidad específica de consumo de los diferentes sustratos analizados (glucosa y azúcares reductores) mediante la aplicación del logaritmo natural a las curvas de consumo de cada uno en función al tiempo de incubación (h). La pendiente de la ecuación de la recta obtenida mediante dicha linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo (r_s); para glucosa se obtuvo un r_s de $0,04 \text{ g}_s/\text{Lh}$, mientras que para azúcares reductores se obtuvo un r_s de $0,11 \text{ g}_s/\text{Lh}$. 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 la velocidad específica de consumo de glucosa igual a $0,02 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$, mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores es igual a $0,04 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$.

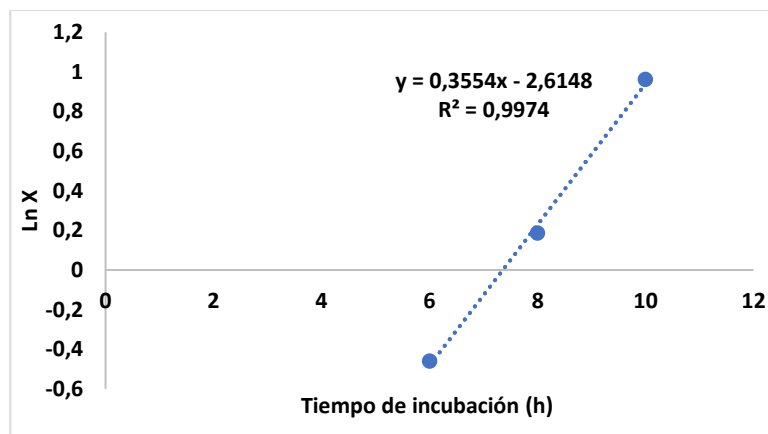


Figura 33: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con melaza de caña aplicando logaritmo natural. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = 0,3554x - 2,6148$ ($R^2 = 0,9974$) corresponde al valor de la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m).

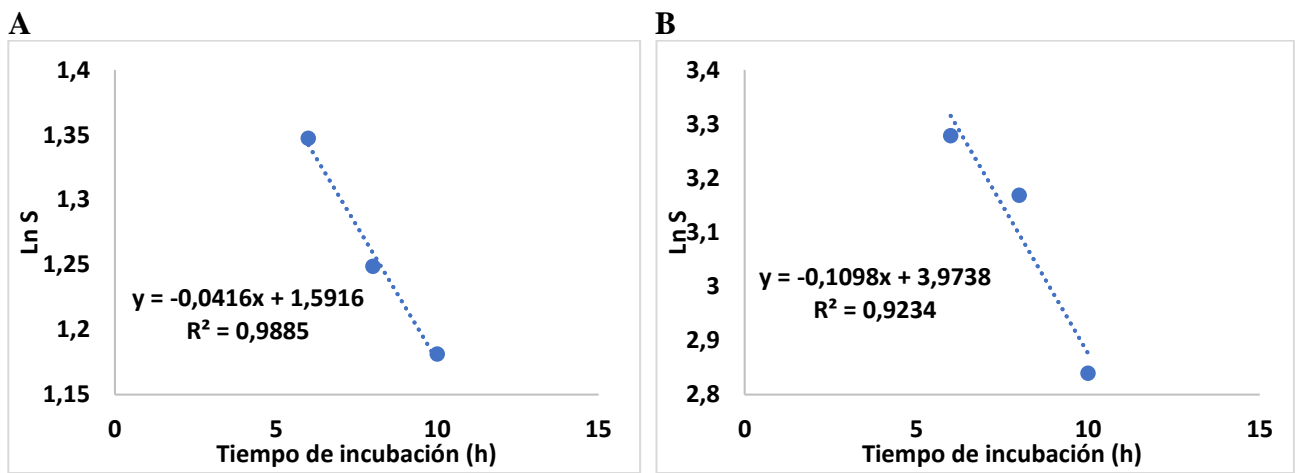


Figura 34: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con melaza de caña. **A)** Linealización de la curva de consumo de glucosa: La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,0416x + 1,5916$ ($R^2 = 0,9885$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s). **B)** Linealización de la curva de consumo de azúcares reductores: La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,1098x + 3,9738$ ($R^2 = 0,9234$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s).

En la **Figura 35** se muestra la variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio con melaza de caña. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue 0,28 g/Lh, y se consiguió a las 30 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica (P_v) de biomasa al final del cultivo fue 0,25 g/Lh (52 hs de incubación).

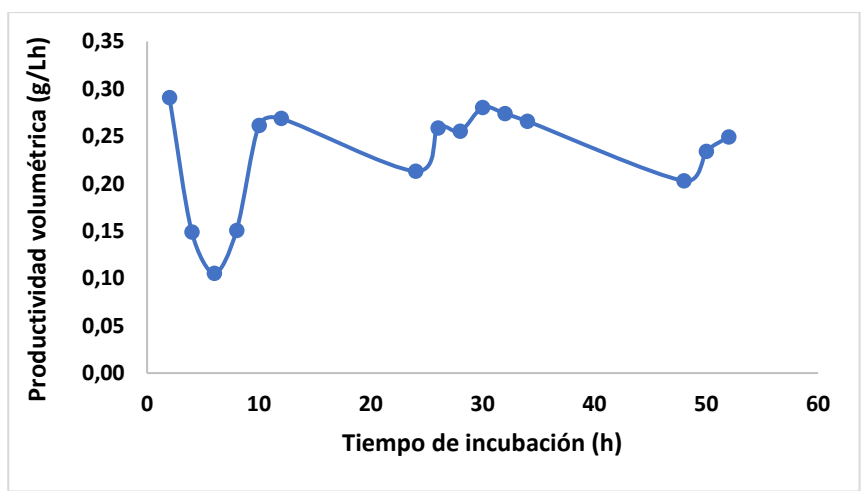


Figura 35: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio a base de melaza de caña.

4.5.2. Crecimiento de *Saccharomyces pastorianus* en medio de cultivo a base de melaza de caña

Del mismo modo a partir de cultivos de *Saccharomyces pastorianus* en medio a base de melaza de caña se evaluaron parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento como ser la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de sustrato (glucosa) (q_s) y el rendimiento de biomasa en función del sustrato (glucosa) consumido ($Y_{x/s}$). En la **Figura 36** se puede observar el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g_x/L), el consumo de azúcares reductores totales (g_s/L) y el consumo de glucosa (g_s/L) en función del tiempo de incubación. El consumo total de glucosa ($4,13 g_s/L$) ocurrió a las 10 h, consiguiéndose en ese tiempo un nivel de biomasa de $6,04 g_x/L$. Posteriormente, a las 26 h de cultivo se consumió prácticamente la totalidad de los azúcares reductores ($24,98 g_s/L$), alcanzando un nivel máximo de biomasa de $9,37 g_x/L$, lo que corresponde a un rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos de $Y_{x/s}$ de $0,34 g_x/g_s$.

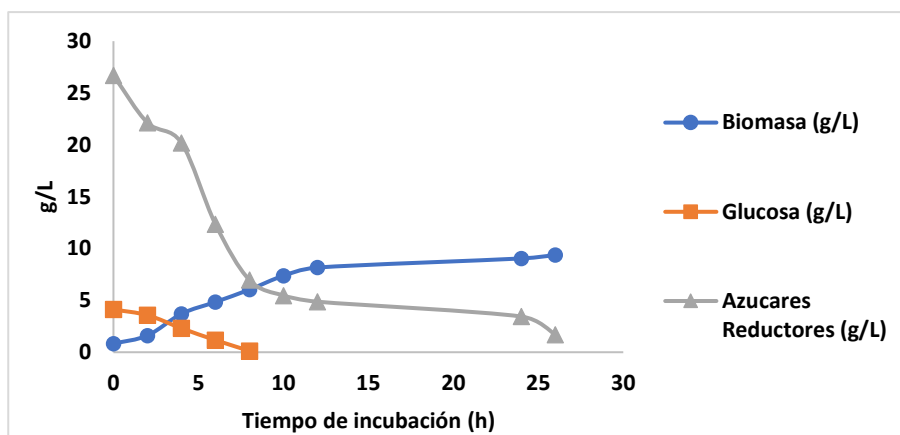


Figura 36: Cultivo de *Saccharomyces pastorianus* en medio de cultivo a base melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas estas en función del tiempo de incubación (h).

Aplicando logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento, para calcular la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) a través de la pendiente de la ecuación de la recta, determinándose que la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) presentó un valor de $0,12 h^{-1}$, con glucosa como principal fuente de carbono (**Figura 37**). Además, se calculó la velocidad específica de consumo de los diferentes sustratos analizados (glucosa y azúcares reductores) mediante la aplicación del logaritmo natural a las curvas de consumo en función al tiempo de incubación. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida mediante dicha linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo (r_s). Para el consumo de glucosa se obtuvo un r_s de $0,72 g_s/Lh$, mientras que para el consumo de azúcares reductores se obtuvo un r_s de $0,27 g_s/Lh$ (**Figura 38**). Al dividir el valor de r_s por la biomasa producida en ese periodo de tiempo se obtuvo la

velocidad específica de consumo de sustrato (q_s). Así, la velocidad específica de consumo de glucosa fue igual a $0,12 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$, mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores es igual a $0,04 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$.

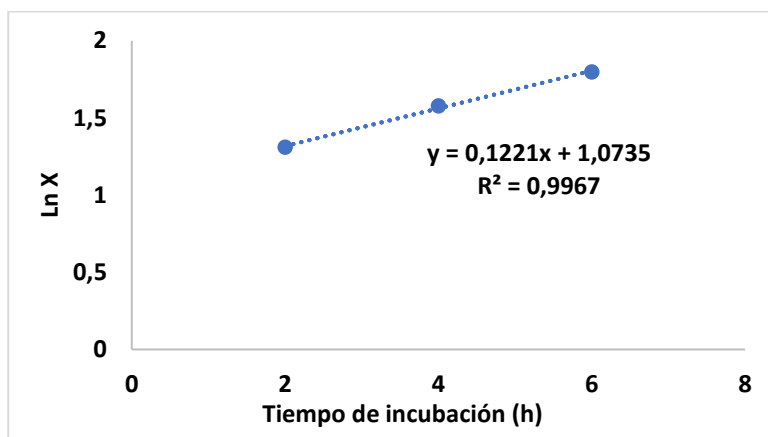


Figura 37: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Saccharomyces pastorianus* en medio con melaza de caña aplicando logaritmo natural. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = 0,1221x + 1,0735$ ($R^2 = 0,9967$) corresponde al valor de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m).

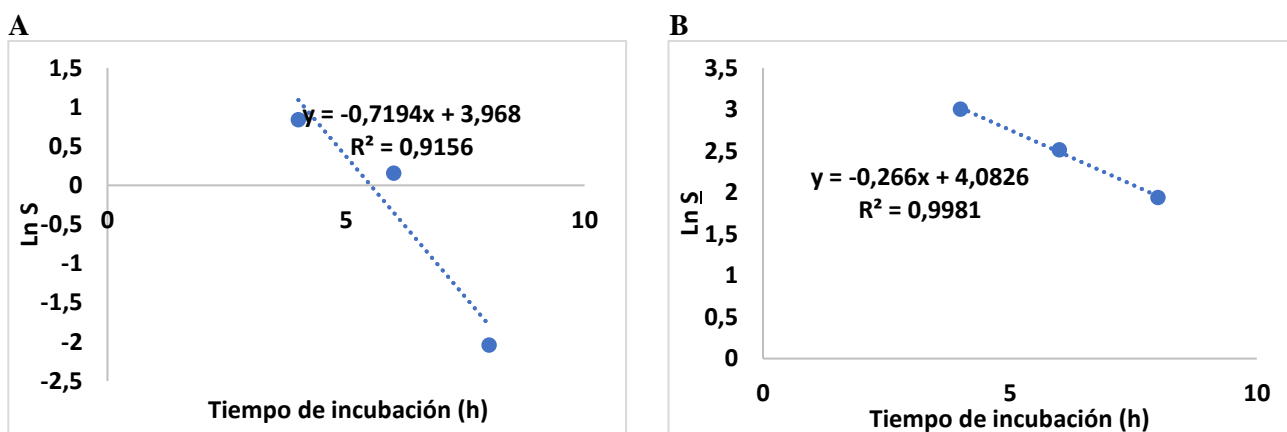


Figura 38: Linealización aplicando logaritmo natural a las curvas de consumo de sustratos en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces pastorianus* en medio con melaza de caña. **A) Linealización de la curva de consumo de glucosa:** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,7194x + 3,968$ ($R^2 = 0,9156$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s). **B) Linealización de la curva de consumo de azúcares reductores:** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida $y = -0,266x + 4,0826$ ($R^2 = 0,92$) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (r_s).

En la **Figura 39** se muestra la variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Saccharomyces pastorianus* en medio con melaza de caña. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue $0,93 \text{ g/Lh}$, y se consiguió a las 4 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica (P_v) de biomasa al final del cultivo fue $0,36 \text{ g/Lh}$ (26 h de incubación).

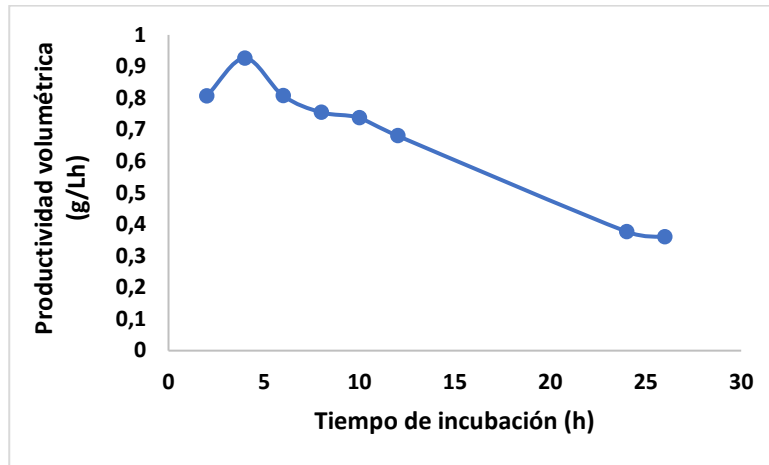


Figura 39: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Saccharomyces pastorianus* en medio con melaza de caña.

Así, los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en el medio alternativo con melaza de caña (**Figura 32** y **Figura 36**), permitieron determinar que el comportamiento de dichas levaduras fue similar, observándose un aumento de la biomasa proporcional a una disminución de los sustratos, en este caso glucosa y azúcares reductores. En las primeras horas de los cultivos de ambas cepas se consumió la glucosa casi en su totalidad, y la concentración de azúcares reductores tuvo un descenso importante en las primeras 12 h de cultivo para ambas cepas. Fajardo y Sarmiento en el 2012, describieron que en las primeras 5 h de cultivo de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de la naturaleza en el medio con melaza de caña, la glucosa residual aumentó ligeramente debido a la presencia de la enzima invertasa que es la encargada de hidrolizar la sacarosa produciendo glucosa y fructosa que son más simples y por lo tanto asimilables para el microorganismo. En contrapartida, en los cultivos que se realizaron se observó una disminución constante de los sustratos con el tiempo, esto podría deberse a que las cepas de levaduras utilizadas a nivel industrial al producirse en medios con una concentración mínima de melaza de caña están adaptadas a los azúcares presentes en la melaza, por lo tanto, los metabolizan de forma más eficiente.

Asimismo, continuando con la comparación del crecimiento entre ambas cepas, se observa que en cuanto a los parámetros rendimiento de biomasa en base al sustrato consumido, nivel máximo de biomasa generada y velocidad específica de crecimiento, la cepa SafAle US-05 de *Saccharomyces cerevisiae* es más eficiente que la cepa SafLager S-23 de *Saccharomyces pastorianus*. Esto podría deberse a las condiciones óptimas de crecimiento de dicha cepa como ser la temperatura, ya que la cepa de *Saccharomyces pastorianus* es más sensible a temperaturas elevadas. Por tal motivo, las fermentaciones para la producción de cerveza tipo lager suelen realizarse a temperaturas entre 5 a 10°C.

En la **Tabla 4** se comparan los parámetros de crecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD y en el medio a base de melaza de caña. El crecimiento a nivel *Erlenmeyer* fue más eficiente en el medio YPD, ya que todos parámetros de crecimiento son más elevados que en el medio alternativo a base de melaza de caña. Esto es debido a que el medio YPD es más rico nutricionalmente por el contenido de extracto de levadura y peptona de carne. Sin embargo, es importante remarcar que el medio tradicional YPD es sumamente costoso justamente por el precio del extracto de levadura y peptona de carne, lo que hace que la producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en dicho medio sea muy poco rentable a nivel industrial. Así, el medio a base de melaza de caña se presenta como una alternativa interesante y rentable para dicho proceso, ya que los parámetros de producción de biomasa con este medio son adecuados y su precio es mucho menor.

Tabla 4: Parámetros de crecimiento de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio complejo YPD y medio de cultivo a base de melaza de caña.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
	Medio YPD	Medio con melaza de caña	Medio YPD	Medio con melaza de caña
Rendimiento de Biomasa en base a glucosa consumida ($Y_x/s, g_x/g_s$)	0,81	0,65	0,67	0,62
Rendimiento de Biomasa en base a azúcares reductores consumidos ($Y_x/s, g_x/g_s$)	0,67	0,34	0,52	0,34
Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m, h^{-1})	0,35	0,36	0,35	0,12
Nivel Máximo de Biomasa (g_x/L)	16,57	12,96	14,22	9,37
Productividad volumétrica Máxima ($P_{vMax}, g_x/Lh$)	0,64	0,28	0,48	0,93

4.6. Escalado de la producción de biomasa líquida de levadura en biorreactor de tanque agitado

Posterior a evaluar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 y *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 a escala *Erlenmeyer* en medio de cultivo (YPD y medio a base de melaza de caña), se realizaron fermentaciones en biorreactor de tanque agitado en pos de escalar la producción de biomasa de dichas cepas. Tal como se mencionó anteriormente, dichas fermentaciones consistieron en una primera etapa de cultivo en lote o *Batch* hasta el consumo total de glucosa, para luego efectuar una etapa *Fed-Batch* alimentando el cultivo con medio YPD con glucosa concentrada 10X o alimentando con una solución con melaza de caña concentrada 10X. Asimismo, a través del software *Eppendorf Bioprocess Control Software (BCS)* se registraron *on-line* los parámetros de las fermentaciones: agitación (rpm), oxígeno disuelto (% O_2d), pH, temperatura ($^{\circ}C$) y alimentación con glucosa concentrada.

Los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento obtenidos a partir del crecimiento de ambas cepas en frascos *Erlenmeyer* conteniendo sendos medios de cultivo, fueron utilizados como valores de referencia para evaluar el escalado de producción de biomasa mediante las fermentaciones en biorreactor.

4.6.1. Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 mediante fermentación en biorreactor con medio YPD

La fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en el biorreactor de tanque agitado conteniendo medio de cultivo YPD se realizó con un pH constante de 5,5 y una temperatura constante de 30°C. Luego de 8 h de cultivo *Batch* se inició la etapa de alimentación con medio YPD con glucosa concentrada 10X aplicando un flujo constante de alimentación. A través de dicha alimentación se agregó un total de 484 ml de medio YPD con una concentración de 200 g/L de glucosa, por lo que al cultivo ingresó una cantidad de 96,8 g de glucosa en un tiempo de 22 h de alimentación.

La alimentación con glucosa se realizó utilizando la siguiente fórmula de Flujo constante de alimentación

$$\text{Ecuación 6} \quad F : \frac{V \cdot \mu \cdot X}{Y_{x/s} \cdot S_R}$$

Siendo

X: concentración de biomasa (g/L),

$Y_{x/s}$: rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido (g_x/g_s),

S_R : concentración de la fuente de carbono en el reservorio de alimentación (g/L),

F: flujo de alimentación (L/h),

V: volumen de cultivo (L),

μ : velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹);

donde se utilizaron los siguientes valores:

X: 6,28 g_x/L,

$Y_{x/s}$: 0,28 g_x/g_s,

S_R : 200 g_s/L,

V: 0,9 L,

μ : 0,25 h⁻¹,

obteniendo un valor de flujo de alimentación constante de 0,02 L/h.

En la **Figura 40** se muestra el registro de los parámetros agitación, oxígeno disuelto, pH y temperatura durante las 30 h de fermentación, donde se puede observar que los parámetros de temperatura y pH se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso de acuerdo con los valores establecidos inicialmente. 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 oxígeno disuelto se mantuvo en un rango aproximadamente entre 40 y 15 % de saturación, por medio de la regulación en cascada con la agitación y el suministro de aire estéril.

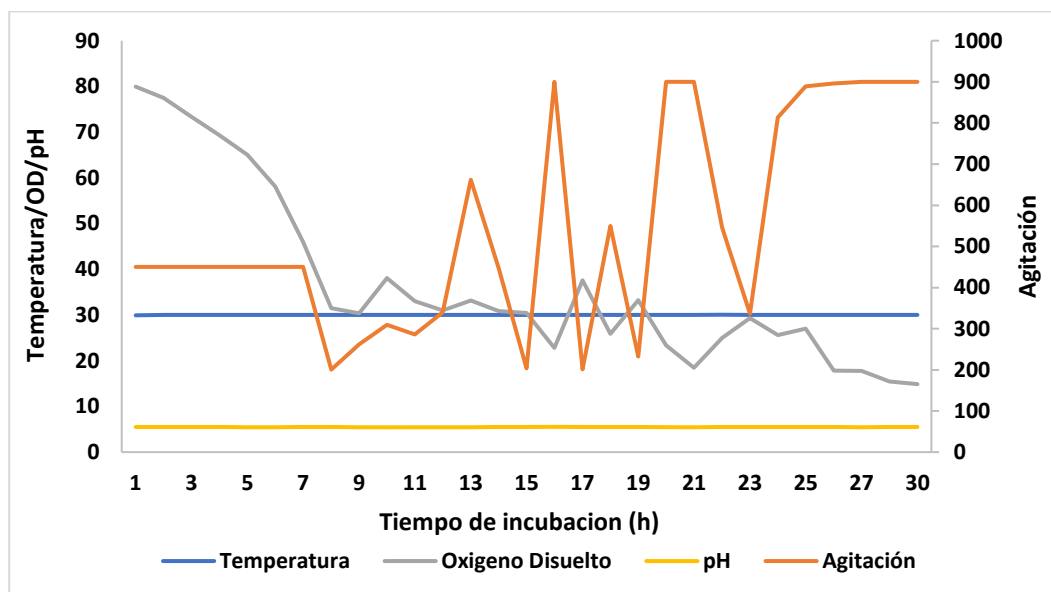


Figura 40: Registro de parámetros de la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor con medio YPD. Línea azul: Temperatura (°C); línea naranja: agitación (rpm); línea gris: oxígeno disuelto (%) y línea amarilla: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

En la **Figura 41** se muestran los resultados obtenidos a partir de la fermentación durante 30 h de proceso, donde se observa que luego de aproximadamente 8 h de fermentación de la etapa *Batch*, la glucosa se consumió casi en su totalidad, consiguiéndose en ese tiempo un nivel de biomasa de 6,28 g_x/L. En ese momento se inició la alimentación con flujo constante de YPD con una concentración de glucosa de 200 g/L. Así, el cultivo siguió creciendo y aumentando el nivel de biomasa, y a las 30 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa con un valor de 35,5 g_x/L.

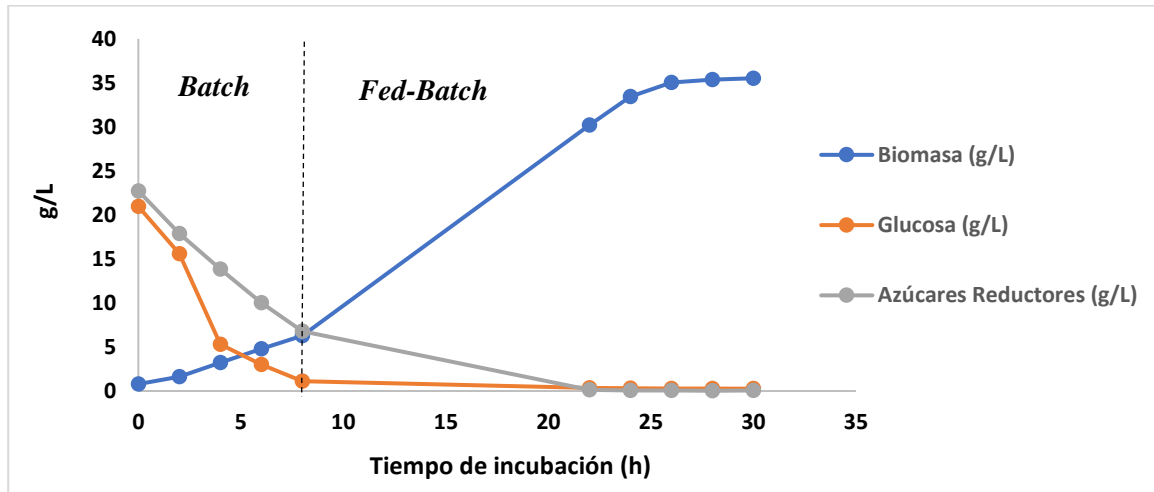


Figura 41: Fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor con medio de cultivo YPD. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función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

En la **Figura 42** se muestra la variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue 1,39 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 (30 h de incubación) fue 1,18 g/Lh.

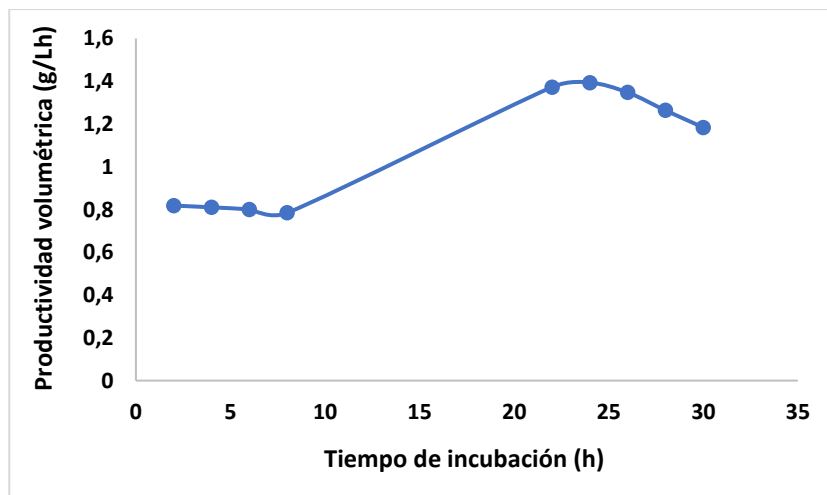


Figura 42: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD en biorreactor de tanque agitado.

4.6.2. Producción de biomasa de *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 mediante fermentación en biorreactor con medio YPD

La fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en el biorreactor de tanque agitado con medio de cultivo YPD se realizó con un pH constante de 5,5 y una temperatura de 30°C. Luego de 8 h de cultivo *Batch* se inició la etapa de alimentación con medio YPD con glucosa concentrada a flujo

constante, en la cual se agregó un total de 360 ml de medio de cultivo YPD con una concentración de 200g/L de glucosa, lo que equivale a 72 g de glucosa en un tiempo de 22 h de alimentación.

La alimentación con glucosa se realizó utilizando la siguiente fórmula de Flujo constante de alimentación:

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

donde el valor de biomasa fue 4,47 g_x/L, el valor de rendimiento (Y_{x/s}) fue 0,22 g_x/g_s, la concentración del sustrato en el reservorio (S_R) fue 414 ml/L, el volumen en el biorreactor fue 0,9 L y la velocidad específica de crecimiento (μ) fue 0,18 h⁻¹. Obteniéndose un valor de flujo de alimentación constante igual a 0,02 L/h.

En la **Figura 43** se observa el registro de los parámetros agitación, oxígeno disuelto, pH y temperatura durante las 30 h de fermentación, donde se puede observar que los parámetros de temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso. Igualmente, se observa que el oxígeno disuelto disminuyó rápidamente en las primeras horas debido al rápido crecimiento de esta levadura con glucosa como fuente de carbono. Luego, el oxígeno disuelto se mantuvo en un rango entre 20 y 40 %, mediante suministro de aire estéril y cascada de agitación este último llegando a valores de 900 rpm hacia el final de la fermentación.

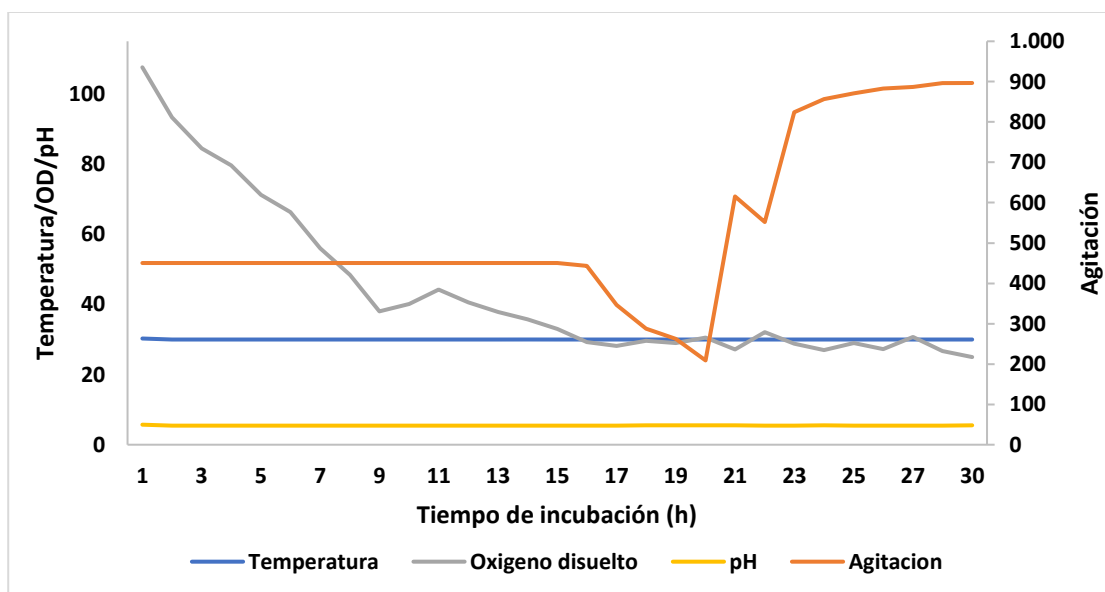


Figura 43: Registro de parámetros de la fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en biorreactor con medio YPD. Línea azul: Temperatura (°C); línea naranja: agitación (rpm); línea gris: oxígeno disuelto (%) y línea amarilla: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

En la **Figura 44** se puede observar los resultados de la fermentación durante 30 h de proceso, donde se observa que luego de 8 h de fermentación de la etapa *Batch*, la glucosa se consumió casi en su totalidad, consiguiéndose en ese tiempo un nivel de biomasa de 4,47 g_x/L. En ese momento se inició la alimentación con flujo constante de YPD con una concentración de glucosa de 200 g/L. Así,

el cultivo continuó creciendo y aumentando en biomasa, y a las 30 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa cuyo valor fue 25,70 g_x/L.

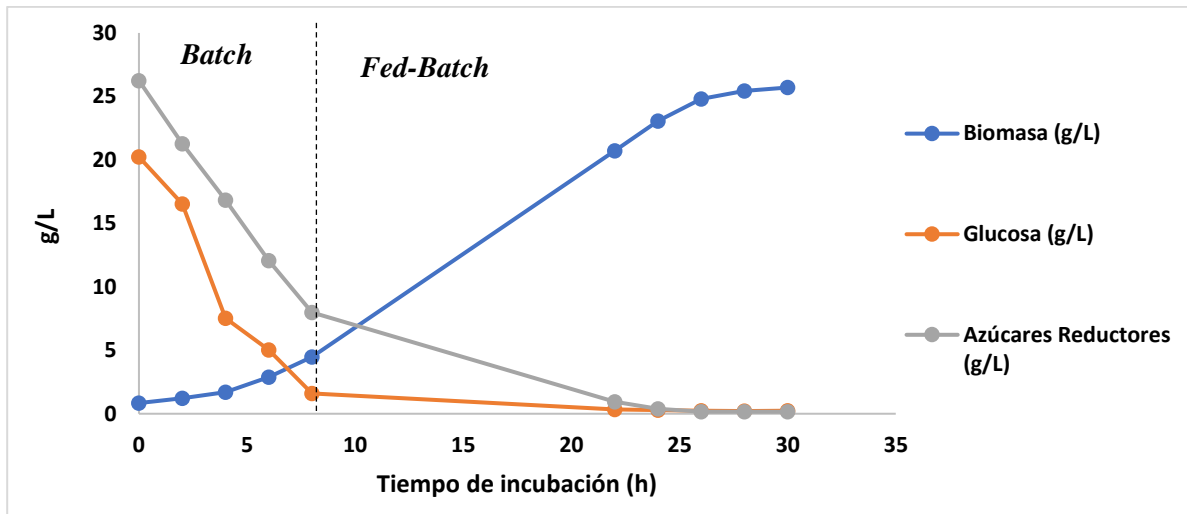


Figura 44: Fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en biorreactor con medio de cultivo complejo YPD. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas estas 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 pastorianus* en medio YPD. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue 1,38 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 (30 h de incubación) fue 1,23 g/Lh.

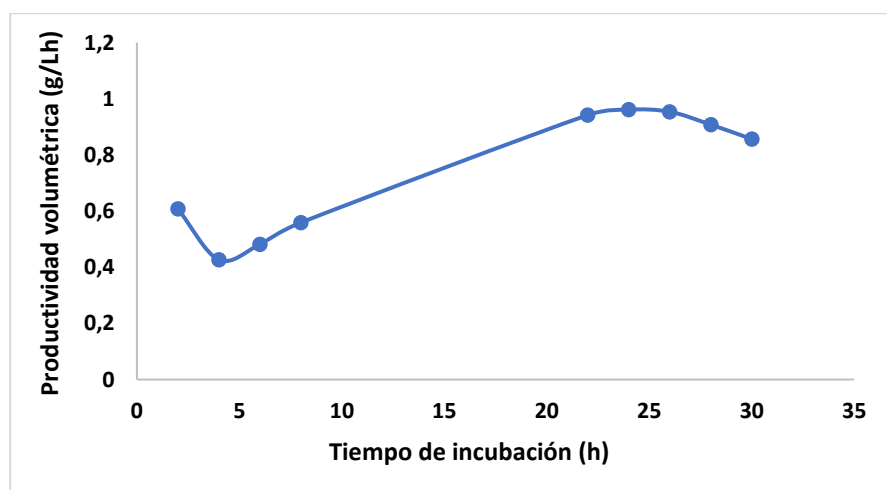


Figura 45: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD en biorreactor de tanque agitado.

4.7. Escalado de la producción de biomasa líquida de levaduras en medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña

Luego de realizar las fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en biorreactor con medio YPD se realizaron fermentación de dichas cepas en medio alternativo a base de melaza de caña. Dichas fermentaciones consistieron en una primera etapa de cultivo *Batch* hasta el consumo total de glucosa, para luego efectuar una etapa *Fed-Batch* alimentando el cultivo con medio alternativo con melaza de caña concentrada. Tal como se mencionó anteriormente, a través del software *Eppendorf Bioprocess Control Software (BCS)* se registraron *on-line* los siguientes parámetros de fermentación: agitación (rpm), oxígeno disuelto (% O₂d), pH, temperatura (°C) y alimentación de melaza concentrada.

4.7.1. Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 en medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña

La fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en el biorreactor de tanque agitado conteniendo medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña se realizó a un pH de 5,5 y una temperatura de 30°C. Después de 8 h de cultivo *Batch* se inició la etapa de alimentación con medio de cultivo concentrado aplicado a un flujo constante, mediante el cual se agregó un total de 401 ml de medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña con una concentración de 414 ml/L de melaza de caña, lo que equivale a 166 ml de melaza de caña en un tiempo de 40 h de alimentación.

La alimentación con melaza de caña se realizó utilizando la siguiente fórmula de Flujo constante de alimentación:

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

donde el valor de biomasa fue 5,4 g_x/L, el valor de rendimiento (Y_{x/s}) fue 0,28 g_x/g_s, el valor de la concentración del sustrato en el reservorio (S_R) fue 414 ml/L, el volumen en el biorreactor fue de 0,9 L y la velocidad específica máxima de crecimiento (μ) fue 0,02 h⁻¹. Obteniéndose un valor de flujo de alimentación constante de 0,01 L/h.

En la **Figura 46** se muestra el registro de los parámetros agitación, oxígeno disuelto, pH y temperatura durante las 48 h de fermentación, donde se puede observar que los parámetros de temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso de acuerdo con los valores establecidos inicialmente. 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 oxígeno disuelto se mantuvo en un rango entre 30 % y 20 % de saturación, mediante cascada agitación y suministro de aire estéril. Al final de

la fermentación se observa que el oxígeno disuelto disminuyó debido al aumento del nivel de biomasa en el cultivo.

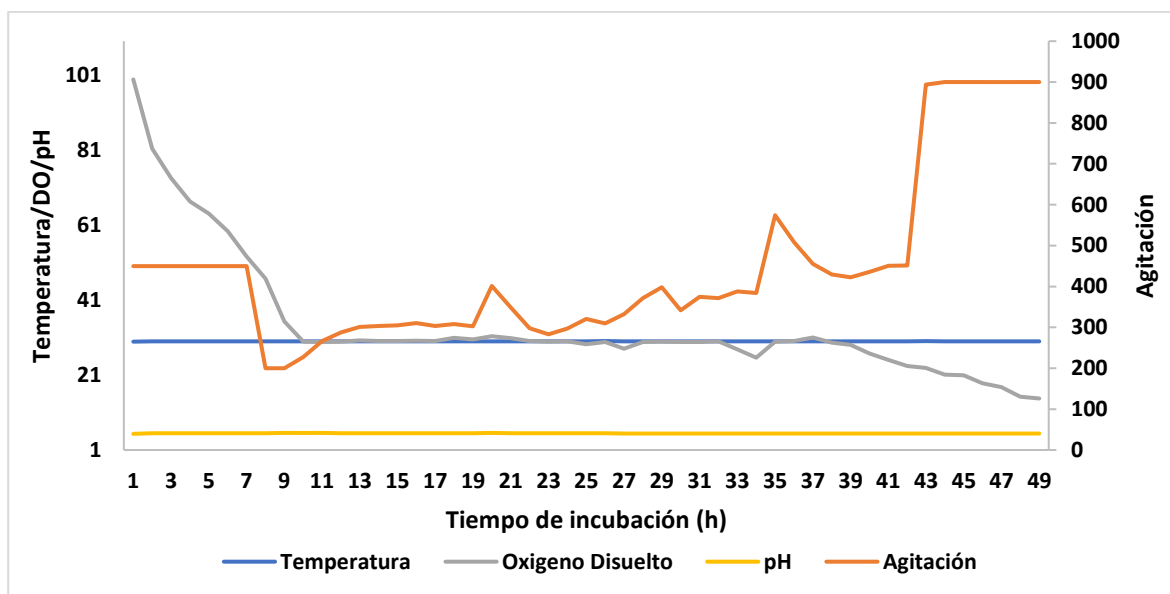


Figura 46: Registro de parámetros de la fermentación de *S. cerevisiae* en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. Línea azul: Temperatura (°C); línea naranja: agitación (rpm); línea gris: oxígeno disuelto (%) y línea amarilla: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

En la **Figura 47** se exhiben los resultados de la fermentación en biorreactor durante las 48 h de proceso, donde se observa que luego de aproximadamente 8 h de fermentación de la etapa *Batch*, la glucosa se consumió casi en su totalidad, consiguiéndose en ese tiempo un nivel de biomasa de 5,4 g_x/L. En ese momento se comenzó la alimentación con el medio de cultivo alternativo con una concentración de melaza de caña de 414 ml/L. Por lo tanto, el cultivo continuó creciendo y la biomasa siguió aumentando. Finalmente, a las 48 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa con un valor de 44,8 g_x/L.

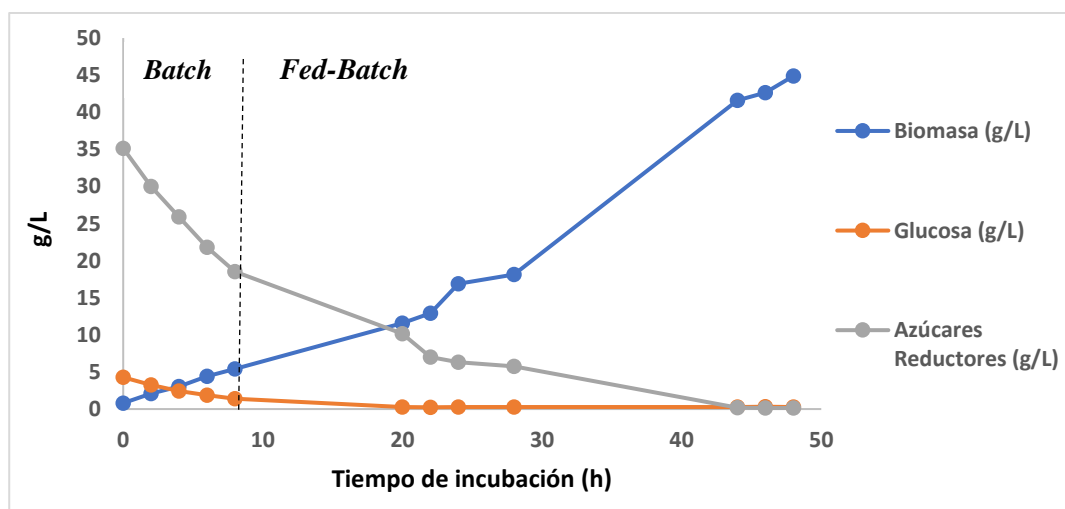


Figura 47: Fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas estas 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 *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue 1,03 g/Lh, y se consiguió a las 2 h de incubación. Mientras que, la productividad volumétrica (P_v) de biomasa al final de la fermentación (48 h de incubación) fue 0,93 g/Lh.

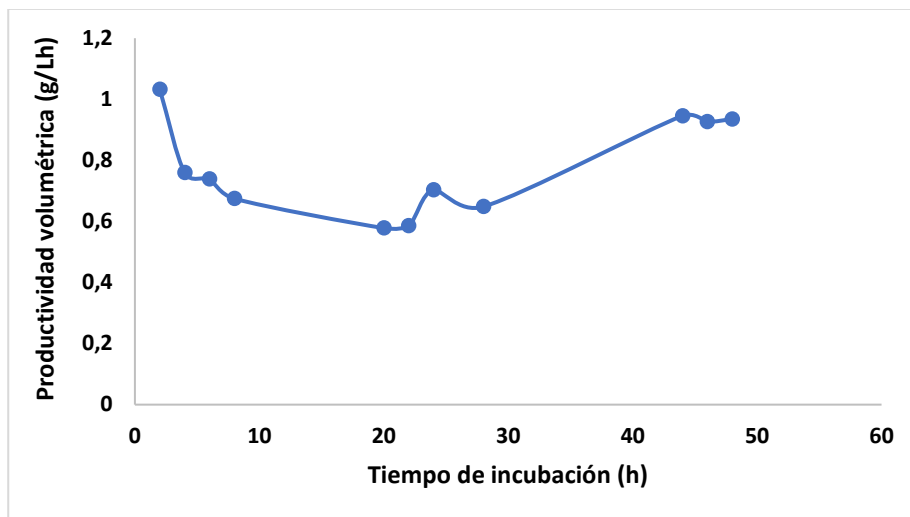


Figura 48: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en medio a base de melaza de caña en biorreactor de tanque agitado.

4.7.2. Producción de biomasa de *Saccharomyces pastorianus* SafLage S-23 en medio a base de melaza de caña

La fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en el biorreactor de tanque agitado conteniendo medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña se realizó con un pH constante de 5,5 y una temperatura de 30°C. Luego de 8 h de cultivo *Batch* se inició la etapa de alimentación con a flujo constante, en la cual se agregó un total de 501 ml de medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña con una concentración de 414 ml/L de melaza de caña, lo que equivale a 207,4 ml de melaza de caña en 40 h de alimentación.

La alimentación con melaza de caña concentrada se realizó utilizando la siguiente fórmula de Flujo constante de alimentación

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

donde el valor de biomasa fue 8 g_x/L, el valor de rendimiento ($Y_{x/s}$) fue 0,21 g_x/g_s, el valor del sustrato en el reservorio (S_R) fue 414 ml/L, el volumen en el biorreactor fue 0,9 L y la velocidad

específica máxima de crecimiento (μ) fue $0,15 \text{ h}^{-1}$. Obteniéndose un valor de flujo de alimentación constante de $0,01 \text{ L/h}$.

En la **Figura 49** se detalla el registro de los parámetros agitación, oxígeno disuelto, pH y temperatura durante las 48 h de fermentación, donde se puede observar que la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso. Asimismo, se observa que el nivel de 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 oxígeno disuelto se mantuvo en un rango cercano al 30 % mediante la función de cascada de agitación y suministro de aire estéril; sin embargo, a partir de las 36 h se observó un descenso gradual del oxígeno disuelto a un nivel cercano a cero, esto se debió al aumento de la cantidad de biomasa en el cultivo.

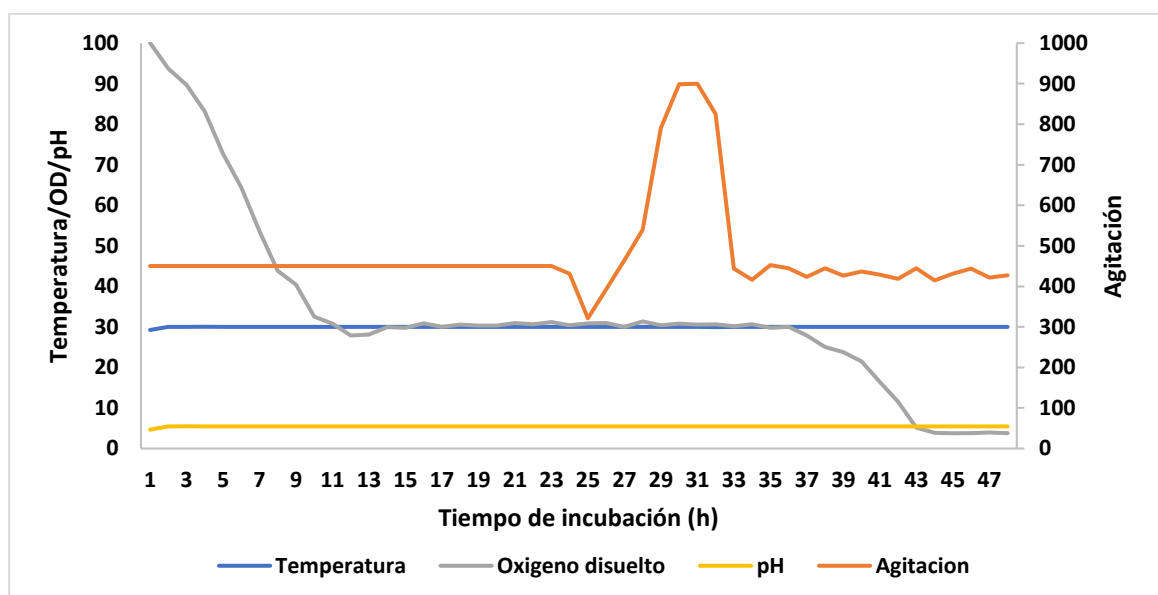


Figura 49: Registro de parámetros de la fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. Línea azul: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); línea naranja: agitación (rpm); línea gris: oxígeno disuelto (%) y línea amarilla: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

En la **Figura 50** se muestran los resultados de la fermentación durante las 48 h de proceso, donde se observa que luego de unas 8 h de fermentación de la etapa *Batch*, la glucosa se consumió casi totalmente, consiguiendo a ese tiempo un nivel de biomasa de $8 \text{ g}_x/\text{L}$. En ese momento se inició la alimentación con el medio de cultivo alternativo con una concentración de melaza de caña de 414 ml/L . De esta manera, el cultivo continuó su crecimiento y aumentando el nivel de biomasa en función del tiempo, hasta que a las 48 h de fermentación se alcanzó el máximo nivel de biomasa ($44,5 \text{ g}_x/\text{L}$).

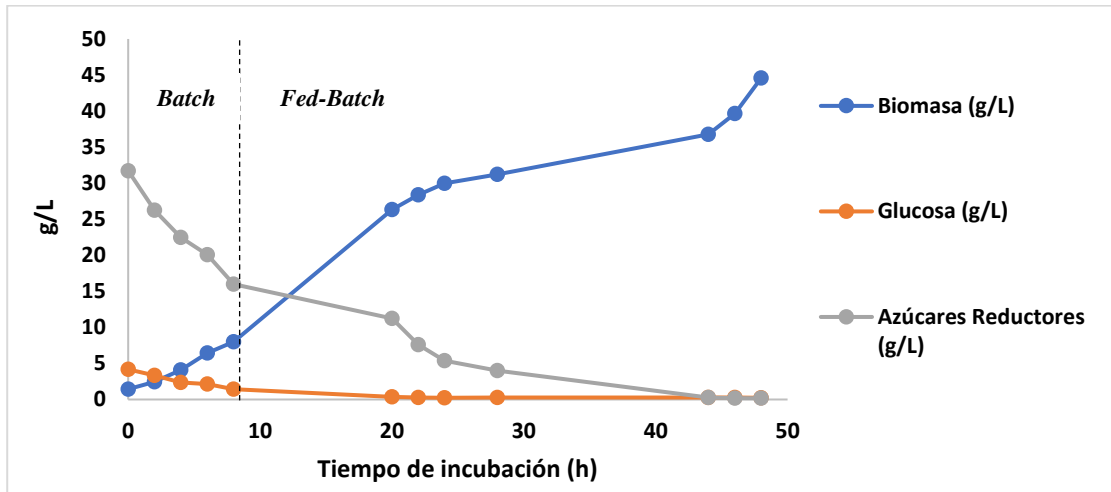


Figura 50: Fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en biorreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas estas en función del tiempo de incubación (h).

En la **Figura 51** se muestra la variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD. Así, se puede observar que la productividad volumétrica máxima (P_{vMax}) de biomasa fue 1,32 g/Lh, y se consiguió a las 20 h de incubación. Mientras que, la productividad volumétrica (P_v) de biomasa al final de la fermentación (48 h de incubación) fue 0,93 g/Lh.

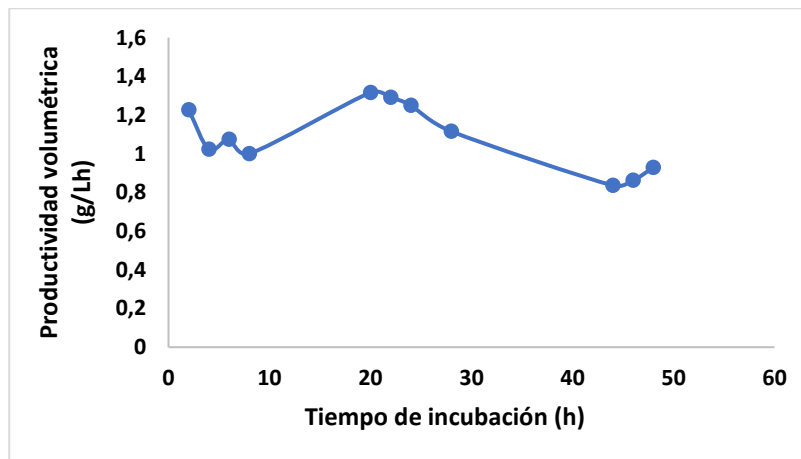


Figura 51: Variación de la productividad volumétrica (P_v) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces pastorianus* en medio a base de melaza de caña en biorreactor de tanque agitado.

En la **Tabla 5** que comparan los parámetros de crecimiento y producción de biomasa de levadura líquida mediante las fermentaciones en biorreactor de tanque agitado para las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio de cultivo YPD y medio alternativo a base de melaza de caña. A diferencia de lo observado para los cultivos en *Erlenmeyer*, los parámetros de crecimiento y producción de biomasa correspondientes a las fermentaciones en

bioreactor resultaron ser mejores para las fermentaciones de ambas cepas en el medio con melaza de caña que en el medio tradicional YPD.

Mediante las fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae*, el nivel máximo de biomasa resultó mayor en el medio a base de melaza de caña que en el medio YPD. Sin embargo, la productividad volumétrica máxima de biomasa fue mayor en el medio YPD que en el medio a base de melaza de caña. Mientras que, para las fermentaciones de *Saccharomyces pastorianus* el nivel máximo de biomasa y la productividad volumétrica máxima de biomasa resultaron mayores con el medio de cultivo a base de caña que con el medio YPD.

Tabla 5: Parámetros de crecimiento y producción de biomasa para las fermentaciones de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en biorreactor de tanque agitado con medio de cultivo YPD y medio alternativo a base de melaza de caña.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
	Medio YPD	Medio a base de melaza de caña	Medio YPD	Medio a base de melaza de caña
Rendimiento de Biomasa en función de glucosa consumida ($Y_{x/s}$, g _x /g _{glucosa})	0,28	0,76	0,21	0,68
Rendimiento de Biomasa en función de azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$, g _x /g _{az.reductores})	0,24	0,27	0,14	0,20
Nivel Máximo de Biomasa (g_x/L)	35,5	44,8	25,7	44,5
Máxima productividad volumétrica de biomasa (g_x/Lh)	1,39	1,03	1,38	1,32

Mediante una comparación de la **Tabla 4**, correspondiente a los cultivos en frascos *Erlenmeyer* y la **Tabla 5** correspondiente a las fermentaciones en biorreactor de tanque agitado, se puede observar, una destacada diferencia en cuanto a los valores obtenidos para los parámetros de nivel máximo de biomasa y productividad volumétrica máxima de biomasa. Para *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD el nivel máximo de biomasa alcanzado en biorreactor fue 18,93 g/L, mayor que en frascos *Erlenmeyer*. Asimismo, la productividad volumétrica máxima de biomasa conseguida en biorreactor fue 0,75 g_x/Lh, mayor que en frascos *Erlenmeyer*. Un resultado similar se observó con *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD, ya que el nivel máximo de biomasa en biorreactor resultó 11,48 g/L, mayor que en frascos *Erlenmeyer* y la productividad volumétrica máxima de biomasa en biorreactor fue 0,9 g_x/Lh, mayor que en frascos *Erlenmeyer*.

Por otro lado, al realizar dicha comparación con los valores obtenidos en medio a base de melaza de caña, se puede observar un resultado semejante, ya que con *Saccharomyces cerevisiae* el nivel máximo de biomasa conseguido en biorreactor fue 31,84 g/L, mayor que en frascos *Erlenmeyer* y la productividad volumétrica máxima de biomasa en biorreactor fue 0,75 g_x/Lh, mayor que en *Erlenmeyer*. Un resultado similar se obtuvo para *Saccharomyces pastorianus*, ya que el nivel máximo

de biomasa en biorreactor fue 35,13 g/L, mayor que en frascos *Erlenmeyer* y la productividad volumétrica máxima de biomasa en biorreactor fue 0,39 g_x/Lh, mayor que en *Erlenmeyer*.

En este sentido, es importante destacar que los resultados obtenidos corresponden con los esperados en este trabajo de tesis y con los descritos por otros autores como Fajardo y Sarmiento (2012), quienes obtuvieron también elevadas cantidades de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor utilizando medio de cultivo con melaza de caña. Cabe resaltar que los elevados niveles de biomasa que se consiguen en biorreactor de tanque agitado se deben a una variedad de factores, como son el ambiente controlado que existe dentro del biorreactor, el suministro de aire constante, la concentración de oxígeno disuelto en un adecuado nivel, y la apropiada agitación que permite la distribución homogénea del sustrato. En definitiva, las condiciones óptimas durante las fermentaciones en biorreactor de tanque agitado, junto con la cantidad de azúcares disponibles en la melaza de caña, permiten la producción de elevadas cantidades de biomasa mediante fermentaciones utilizando un medio de cultivo rentable económicamente y alternativo al medio tradicional YPD.

5. CONCLUSIONES

A partir de la puesta a punto y validación de las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores se logró determinar que dichos métodos son certeros y permiten alcanzar una destacada repetibilidad. La utilización de estas metodologías y junto con los gráficos de control de valor medio, permitieron obtener resultados confiables.

Asimismo, mediante cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 y *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 en frascos *Erlenmeyer* con el medio tradicional YPD y el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña, se determinaron parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de dichas cepas. Los resultados obtenidos para dichos parámetros se utilizaron como referencia en el proceso de producción de biomasa de levaduras líquidas mediante fermentación en biorreactor con ambos medios de cultivo.

Así, luego de evaluar el crecimiento de los cultivos de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en frascos *Erlenmeyer* con medio YPD y medio con melaza de caña, se efectuó el escalado de la producción de biomasa mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado a escala laboratorio. Para tal fin se aplicó una estrategia de fermentación conformada por una primera etapa de cultivo en lote o *Batch* hasta el consumo total de glucosa, para luego efectuar una etapa *Fed-Batch* de alimentación con glucosa o melaza de caña concentrada. En todas las fermentaciones realizadas en biorreactor se controlaron los parámetros pH, oxígeno disuelto, temperatura y agitación a lo largo de proceso completo. La alimentación de los sustratos concentrados se realizó aplicando un flujo de alimentación contante lo que permitió aumentar el nivel de biomasa producido.

A partir de la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 en biorreactor con medio YPD se consiguió un rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos de 0,28 g_x/g_s y una productividad volumétrica máxima de biomasa de 1,39 g_x/Lh. Asimismo, en la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 realizada con el medio a base de melaza de caña, se obtuvo un rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos de 0,76 g_x/g_s y una productividad volumétrica máxima de biomasa de 1,03 g_x/Lh, valores comparables con los obtenidos con el medio YPD. En este sentido, es importante remarcar que el máximo nivel de biomasa obtenido mediante fermentación con el medio de cultivo a base de melaza de caña (44,88 g_x/L) fue mayor al obtenido con el medio YPD (35,52 g_x/L), debido al mayor contenido de azúcares reductores en el medio con melaza de caña.

Por otro lado, en la fermentación de *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 realizada en biorreactor conteniendo medio YPD se alcanzó un rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos de 0,21 g_x/g_s y una productividad máxima de 1,38 g_x/Lh. Mientras, que en la fermentación de *Saccharomyces pastorianus* realizada en medio a base de melaza de caña, los valores

de rendimiento (0,68 g_x/g_s) y productividad volumétrica de biomasa (1,32 g_x/L h) fueron mayores que los obtenidos con el medio YPD. Asimismo, el máximo nivel de biomasa alcanzado en el medio a base de melaza de caña (44,5 g/L) fue mayor al obtenido en el medio YPD (25,7 g/L).

En conclusión, en este trabajo de tesis se realizó la puesta a punto y validación de las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores para conseguir las determinaciones de dichos parámetros a partir de cultivos en frascos Erlenmeyer y fermentaciones en bioreactor de tanque agitado con medio de cultivo YPD y medio con melaza de caña azúcar. Por otra parte, se consiguió realizar la evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 y *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 en frascos *Erlenmeyer* con el medio YPD y con el medio alternativo a base de melaza de caña, determinando parámetros cinéticos y estequiométricos.

Asimismo, se consiguió llevar adelante el escalado del proceso de producción de biomasa líquida de ambas cepas de levaduras cerveceras mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado de laboratorio, ya sea en el medio de cultivo YPD como en el medio alternativo a base de melaza de caña. Asimismo, cabe remarcar que la estrategia de cultivo *Batch* alimentado o *Fed-Batch* resultó adecuada para concretar estas fermentaciones en biorreactor.

De este modo, se consiguió obtener a escala de biorreactor, elevados niveles de biomasa líquida de las levaduras cerveceras *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 y *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23, mediante fermentaciones con el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. Cabe remarcar, que para ambas levaduras se consiguieron niveles de biomasa mayores con el medio alternativo a base de melaza de caña que con el medio de cultivo tradicional YPD. Estos resultados permiten indicar que la producción de biomasa líquida de ambas levaduras cerveceras mediante fermentación en biorreactor con medio a base de melaza, resulta ser un proceso biotecnológico factible y rentable.

En definitiva, la producción de biomasa de levaduras mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado a partir de un proceso rentable y con un medio de cultivo económico como el medio a base de melaza de caña, permitirá obtener biomasa líquida de levaduras cerveceras con el fin de sustituir la importación de las levaduras secas activas y evitar los potenciales riesgos de producción que la levadura seca presenta.

6. BIBLIOGRAFIA

- Argote, F., Cuervo, R., Osorio, E., Delgado, J., Villada, H. 2015. Evaluación de la producción de etanol a partir de melaza con cepas nativas *Saccharomyces cerevisiae*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Volumen 13(2). 40-48.
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., Chirinos, M. 2012 Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui Trelease*. Multiciencias, 12:129-135.
- Bardorf, J. 1987. The technology of aerobic yeast growth. En Berry, D., Stewart, G. y Russel, I. (Eds). Yeast Biotechnology. Unwin Hyman Ltd.
- Barford, J. 1990. A general model for aerobic yeast growth: Batch growth. Biotechnology and Bioengineering. 35: 907-920.
- Bautista-Justo, M., García, L., Barboza, J. Parra, L. 2001. EL Agave tequilana Weber Y LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA. Acta Universitaria. 11: 26-34.
- Bazzari, B., Piercy, M. Paulson, A., Warnat, S., Hubbard, T. MacIntosh, A. 2018. Rehydration of active dried yeast: impact on strength and stiffness of yeast cells measured using microelectromechanical systems. Journal Institute of Brewing. 125:1. 53-59.
- Bernstein, H. Bernstein, C. 2019. Sexual Processes in Microbial Eukaryotes En G. Bastidas (Ed). Parasitology and Microbiology Research (36-41). Editorial Intechopen.
- Bertola, N., Bevilacqua, A. Contreras, E. 2007. Análisis de Reactores Biológicos. En Schmidell W., Soares H.M., Echeberrere C., Menes R.J., Bertola N., Contreras E.M. (Ed). Tratamiento Biológico de Águas Residuárias (201-215). Editora Tribo da Ilha.
- Bottari, Campari, G. Gatti, M. 2014. LIVE/DEAD YEAST VIABILITY STAINING AS A TOOL FOR IMPROVING ARTISANAL PILSNER BEER PRODUCTION. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 4 (2): 174-178.
- Buitrajo, J. y Tenjo, D. 2007. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá. 7-12.
- Cardozo, M., Moreno, J. 2012. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE MELAZA DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá. 15-30.
- Enciso, V. 2019. PRODUCCION y COMERCIALIZACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR y AZÚCAR. Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Asunción. Recuperado de: http://www.agr.una.py/ecorural/ecorural_otras_publicaciones.php
- Espinoza, V. 2014. UTILIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum L.*) COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces boulardii L.*, MACHALA 2014. Tesis de pregrado Bioquímico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud. Universidad Técnica de Machala. 6-8
- Eurolab España. 2016. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.
- Fajardo, E. y Sarmiento. 2007. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá. 22-42.
- Ferreira, I., Pinho, O., Vieira, E. Tavela, J. 2010. Brewers *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. ELSEVIER. 11(2): 77-84.
- Friedmann, A., Penner, R. 2010. Azúcar orgánica: potencial de negocios. (USAID/Paraguay 346: 55-59.
- Gibson, B., Litt, G. 2015. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. Yeast. 32: 17–27.
- González, M. 2017. Principios de la Elaboración de cervezas artesanales. Lulu Enterprises – Lulu Press Inc. North Carolina, USA. 115.

- Grande, C., 2016. *Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales*. Cali, Colombia. Editorial Bonaventuriana. 36-42.
- Hassan, S., Zohri, A. Kassim, R. 2019. Electricity generation from sugarcane molasses using microbial fuel cell technologies. 178: 538-543.
- Hensirisak, P. 1997. SCALE-UP THE USE OF A MICROBUBBLE DISPERSION TO INCREASE OXYGEN TRANSFER IN AEROBIC FERMENTATION OF BAKER'S YEAST. Tesis de maestría. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 41-66.
- Instituto de Salud Pública de Chile. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.
- Jenkins, D. 2011. THE IMPACT OF DEHYDRATION AND REHYDRATION ON BREWING YEAST. Tesis PhD. Universidad de Nottingham. 10-30.
- Jenkins, D., Powell, C., Fischborn, T. Smart, K. 2011. Dried Yeast: Impact of Dehydration and Rehydration on Brewing Yeast DNA Integrity. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 68(3):132-138.
- Jenkins, D., Powell, C., Fischborn, T. Smart, K. 2011. Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and its Effect on Cell Viability. *JOURNAL OF THE INSTITUTE OF BREWING*. 117: 377-382.
- Jossen, V., Eibl, R., Portner, R., Kraume, M. Eibl, D. 2017. Stirred Bioreactors. En Larroche, C., Sanromán, M., Du, G. Pandey, A. (Ed). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. (179-215). Editorial ELSEVIER.
- Livienne, J. y Lim, H. 1982. The growth and dynamics of *Saccharomyces cerevisiae*. En Tsao, G (Ed). *Annual Reports on Fermentation Processes*. Editorial ELSEVIER.
- Luján, V., Yparraguirre, L. 2006. Diseño y operación de reactores bioquímicos para la obtención de metabolitos de alcohol etílico y ácido cítrico a nivel laboratorio. Tesis pregrado Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 11-27.
- Martínez, A. 2015. Estudio de la expresión de proteína heteróloga en levaduras a partir de subproductos de la industria alimentaria. Tesis de posgrado Biotecnología Avanzada. Universidade da Coruña. España. 23-31.
- Nielsens, O. 2010. Status of the yeast propagation process and some aspects of propagation for re-fermentation. ELSEVIER. 35: 71-74.
- Obregón-Luna, J. 2013. INCIDENCIAS DEL COMPORTAMIENTO NORMAL DE LA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN LAS TECNOLOGÍAS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. *Márgenes*. 1(2).
- Olbrich, H. 1963. THE MOLASSES. *Fermentation Technologist*, Institut für Zuckerindustrie. Publicado por Biotechnologie-Kempe GmbH.
- Oliveira, F., Puga, S. Ferreira, C. 2013. Yeast: World's Finest Chef. En I. Muzzalupo (Ed). *Food Industry* (519-547). Editorial Intechopen.
- Otterstedt, K. Larsson, C. Bill, R., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S. Gustafsson, L. 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Molecular Biology Organization*. 5 (5): 532-537.
- Panda, T. 2011. *Bioreactors: Analysis and Design*. New Delhi. Editorial Mc Graw Hill. 10-12.
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Barcena, J. Matallana, E. 2005. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Applied and environmental microbiology*. 71: 6831-6837.
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A. y Matallana, E. 2015. Yeast biomass, an optimized product with myriad in food industry. ELSEVIER. 46:167-175.

- Ramírez, M. 2008. Cultivos para la producción sostenible de biocombustibles: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos – Caña de azúcar. Impresiones Industriales. Tegucigalpa - Honduras. 5.
- Rodríguez-Porrata, B., Camora-Gutierrez, D., López-Martinez, G., Reisenbichler, A., Bauer, M., Madeo, F. Cordero-Otero, R. 2012. Yeast Cell Death During the Drying and Rehydration Process. *Flow Cytometry - Recent Perspectives*. 128-129.
- Scragg, A. 1991. *Bioreactors in Biotechnology: A Practical Approach*. Michigan. Ellis Horwood Limited, England.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. 2017. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*. 7:2087.
- Sobieszuk, P., Strzyewska, A. y Ulatowski, K. 2021. Investigation of the possibility of culturing aerobic yeast with oxygen nanobubble addition and evaluation of the results of *batch* and semi-*batch* cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *ELSEVIER*. 159: 1-9.
- Suarez-Machín, C., Garrido-Carralero, A. y Guevara-Rodríguez, C. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 50: 20-28.
- Tanghe, A., Van Duck, P., Dumortier, F., Teunissen, A., Hohmann, S., Thevelein, J. A. 2002. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in bakers yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5981-5989.
- Trinder, P. 1969. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*. 6: 24-70.
- Valero, 2008. EVALUACIÓN DE LA FLOCULACIÓN EN UNA CEPA INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* Y SU CARACTERIZACIÓN. Tesis de Maestría en Ciencias de Alimentos. Universidad Simón Bolívar. 3-5.
- Valencia, A. Zapata, C. 2014. Remoción de Calcio y Magnesio de la melaza para el mejoramiento del proceso de Fermentación. Tesis de pregrado Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Trujillo. Perú, Trujillo. 2-18.
- Vital, P. Larralde, C. 2016. Respuestas metabólicas al estrés en levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 67:86-91.
- Yang, Y. Sha, M. A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – *Batch, Fed-Batch, and Continuous Fermentation*. 2019. Eppendorf. https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/763594/FermentorsBioreactors_Application-Note_408_BioBLU-f-Single-Vessel_A-Beginner%E2%80%99s-Guide-Bioprocess-Modes-Batch_Fed-Batch-Continuous-Fermentation.pdf