



# INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA

---

---

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS  
CINÉTICOS DE *Saccharomyces cerevisiae* EN  
MEDIO DE CULTIVO A BASE DE *Carica papaya*,  
CON Y SIN AIREACIÓN**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO BIOQUÍMICO**

P R E S E N T A N

**NIVER ISAAC QUINTERO GUTIÉRREZ  
FERNANDO SÁNCHEZ GARCÍA**

**ASESOR:**

**M. C. OSWALDO CASTOR ORTIZ ZAMORA**

**MISANTLA, VERACRUZ.**

**MARZO, 2020.**



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

FECHA: 09 de Marzo de 2020

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN  
DE TESIS PROFESIONAL.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hago constar que el (la) C:

NIVER ISAAC QUINTERO GUTIÉRREZ

pasante de la carrera de INGENIERÍA BIOQUÍMICA con No. de Control 152T0480 ha cumplido satisfactoriamente con lo estipulado por el **Manual de Procedimientos para la Obtención del Título Profesional de Licenciatura** bajo la opción **Titulación Integral (Tesis Profesional)**

Por tal motivo se **Autoriza** la impresión del **Tema** titulado:

**“EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Saccharomyces cerevisiae* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE *Carica papaya*, CON Y SIN AIREACIÓN”**

Dándose un plazo no mayor de un mes de la expedición de la presente a la solicitud del Acto de Recepción para la obtención del Título Profesional.

ATENTAMENTE

ING. GERBACIO TLAXALO ESPINOZA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



Archivo.

VER. 01/03/09

F-SA-39



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

FECHA: 09 de Marzo de 2020

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS PROFESIONAL.

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente hago constar que el (la) C:

**FERNANDO SÁNCHEZ GARCÍA**

pasante de la carrera de INGENIERÍA BIOQUÍMICA con No. de Control 152T0069 ha cumplido satisfactoriamente con lo estipulado por el **Manual de Procedimientos para la Obtención del Título Profesional de Licenciatura** bajo la opción Titulación Integral (Tesis Profesional)

Por tal motivo se **Autoriza** la impresión del **Tema** titulado:

**“EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Saccharomyces cerevisiae* EN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE *Carica papaya*, CON Y SIN AIREACIÓN”**

Dándose un plazo no mayor de un mes de la expedición de la presente a la solicitud del Acto de Recepción para la obtención del Título Profesional.

ATENTAMENTE

ING. GERBACIO TLAXALO ESPINOZA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



Archivo.

VER. 01/03/09

F-SA-39

## **AGRADECIMIENTOS**

*Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.*

*Le doy a gracias a mis padres Verónico Sánchez Sánchez y María Luisa García Hernández por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, y a mis hermanos por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar.*

*Agradezco también a mi asesor M.C. Oswaldo C. Ortiz Zamora por habernos brindado el apoyo, la orientación y sus conocimientos para la realización de este interesante proyecto.*

*Finalmente agradezco a quien lee este apartado y más de mi tesis, por permitir a mis experiencias investigaciones y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información mental.*

Fernando Sánchez García

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a Dios por bendecirnos la ida, por guiarme a lo largo de mi existencia, al el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.*

*Gracias a mis padres: Isaac Quintero Ávila y Leonides Gutiérrez Sánchez, por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado. También quiero agradecer a mi novia Elizabeth Rivera Bonilla por estar conmigo en éxito de este proyecto, a mi Hijo Niver Isaac Quintero Rivera por ser mi mayor motor y motivarme para salir adelante a pesar de las circunstancias y a mi hermana Nidia Quintero Gutiérrez por el gran apoyo y grandes consejos que siempre me brindaban sabiduría. Y toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.*

*Agradezco a los docentes del Instituto Tecnológico Superior de Misantla, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión como la ingeniera Heidi y la ingeniera Aracely, de manera especial al MC. Oswaldo C. Ortiz Zamora por el asesor de mi proyecto quien me apoyo con su paciencia, y su rectitud como docente.*

Niver Isaac Quintero Gutiérrez

## RESUMEN

Los nutrientes representan la principal fuente de energía para los seres humanos y los animales; a su vez, son indispensables para la salud de dichos organismos. Se han estudiado alternativas sustentables para la producción de nutrientes, siendo un ejemplo la producción de biomasa celular en medios de cultivo a base de sustratos renovables (como las frutas) y subproductos de procesos industriales.

Por este motivo, se evaluó el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo a base de papaya (*Carica papaya*) (MCBP), con y sin aireación (2.4 L/min), empleando el medio mínimo de sales (MMS) como medio de cultivo de control y los parámetros cinéticos de dicho microorganismo en las condiciones mencionadas. Las concentraciones para MCBP y MMS fueron 33.33%Peso/Volumen y 100 g/L sacarosa, respectivamente.

Para el cultivo de *S. cerevisiae*, se inocularon 3,500,000 cel/ml en 800 ml de los medios de cultivo mencionados (experimentos triplicados); se monitoreó la población celular cada cuatro horas (mediante conteo directo en cámara de Neubauer), obteniéndose de cada curva de crecimiento celular los parámetros cinéticos promedio correspondientes, siendo éstos: la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), la velocidad de división promedio ( $\delta$ ), el tiempo de duplicación ( $t_d$ ), el número de generaciones ( $n$ ), y la máxima población celular alcanzada durante la fase exponencial ( $Cn_{max}$ ).

Para ello, se obtuvo un crecimiento de *S. cerevisiae* favorecido en ambos medios de cultivo (MMS y MCBP) cuando se suministra aire (reflejándose en  $n$  y  $Cn_{max}$ ). Tomando como referencia el MMS, se determinó que en condición anaerobia el microorganismo se reprodujo rápidamente en el MCBP ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $t_d$  y  $n$  aumentaron), sin embargo, el valor de  $Cn_{max}$  se redujo; en condición aerobia el microorganismo se reprodujo rápidamente ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $t_d$  aumentaron), se obtuvo mayor  $n$  en ese medio de cultivo, el valor de  $Cn_{max}$  disminuyó.

**Palabras clave:** Aireación, *Carica papaya*, cinética microbiana, condiciones de crecimiento celular, medio mínimo de sales, parámetros cinéticos, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
RESUMEN .....	V
CAPÍTULO I - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
1.1 Introducción .....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	2
1.3 Justificación .....	3
1.4 Objetivos .....	4
1.4.1 Objetivo general .....	4
1.4.2 Objetivos específicos .....	4
1.5 Hipótesis .....	4
1.6 Alcances .....	5
1.7 Limitaciones .....	5
CAPÍTULO II - MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 Levaduras .....	6
2.1.1 Generalidades .....	6
2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
2.1.3 Recuperación de levadura .....	7
2.1.4 Factores de crecimiento y desarrollo de la levadura .....	7
2.2 Medio mínimo de sales (MMS) .....	8
2.3 <i>Carica papaya</i> .....	9
2.3.1 Propiedades .....	10
2.3.2 Composición química .....	11
2.4 Crecimiento celular .....	12
2.4.1 Curva de crecimiento celular .....	12
2.4.2 Fases del crecimiento celular .....	13
2.4.3 Métodos de medición del crecimiento .....	14
2.5 Parámetros cinéticos .....	18
2.5.1 Determinación de los parámetros cinéticos .....	19
2.5.1.1 Número de generaciones ( $n$ ): .....	19
2.5.1.2 Velocidad de división promedio ( $\delta$ ) .....	20
2.5.1.3 Tiempo de duplicación ( $t_d$ ) .....	21
2.5.1.4 Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ) .....	22
2.5.1.5 Velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) .....	22

CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Búsqueda y revisión bibliográfica.....	25
3.2 Elaboración del diseño experimental completamente al azar.....	25
3.3 Obtención de la materia prima.....	26
3.4 Selección del microorganismo.....	26
3.5 Reactivación de la cepa.....	26
3.6 Realización de las cinéticas microbianas.....	27
3.7 Determinación y evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> .....	28
CAPÍTULO IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1 Medio mínimo de sales (MMS).....	29
4.1.1 Sin aireación.....	29
4.1.1.1 Parámetros cinéticos.....	31
4.1.2 Con aireación.....	37
4.1.2.1 Parámetros cinéticos.....	39
4.1.3 Resumen de los parámetros cinéticos.....	44
4.2 Medio de cultivo a base de <i>Carica papaya</i> (MCBP).....	44
4.2.1 Sin aireación.....	45
4.2.1.1 Parámetros cinéticos.....	46
4.2.2 Con aireación.....	50
4.2.2.1 Parámetros cinéticos.....	52
4.2.3 Resumen de los parámetros cinéticos.....	55
4.3 Medio de cultivo a base de <i>C. papaya</i> en el Biorreactor (MCBPB).....	55
4.3.1 Biorreactor sin aireació.....	55
4.3.1.1 Parámetros cinéticos en el Biorreactor.....	57
4.3. Biorreactor con aireación.....	59
4.3.2.1 Parámetros cinéticos en el Biorreactor.....	61
4.3.3 Resumen de los parámetros cinéticos.....	64
CAPÍTULO V – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
5.1 Conclusiones.....	65
5.2 Recomendaciones.....	66
REFERENCIAS.....	67
ANEXOS.....	69



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de colonias microbianas (Prescott et al, 2002). .....	6
Figura 2. <i>Carica papaya</i> (Koehler,1887). .....	9
Figura 3. Curva de proliferación típica de una población microbiana (Fuente: elaboración propia). .....	13
Figura 4. Cámara de Neubauer observada en el microscopio (Fuente: elaboración propia). .....	15
Figura 5. Esquema general del trabajo. ....	24
Figura 6. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación (Fuente: elaboración propia). ...	30
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	30
Figura 8. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	31
Figura 9. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, tratamiento 1 (Fuente: elaboración propia). .....	32
Figura 10. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación (Fuente: elaboración propia). ..	37
Figura 11. Curva de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	38
Figura 12. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	39
Figura 13. Medio de cultivo a base de <i>C. papaya</i> (Fuente: elaboración propia). .....	45
Figura 14. Curva de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	46
Figura 15. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	46
Figura 16. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación tratamiento 3 (Fuente: elaboración propia). .....	48
Figura 17. Curva de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	51
Figura 18. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	51
Figura 19. Curva de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	56

Figura 20. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	57
Figura 21. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB sin aireación (Fuente: elaboración propia). .....	57
Figura 22. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	60
Figura 23. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	61
Figura 24. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMS en biorreactor con aireación (Fuente: elaboración propia). .....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del MMS. ....	9
Tabla 2. Composición de C. Papaya por cada 100g (USDA, 2018). ....	12
Tabla 3. Diseño experimental: .....	26
Tabla 4. Composición del MMS empleado. ....	27
Tabla 5. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, T1.....	33
Tabla 6. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, T2.....	33
Tabla 7. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, T3.....	34
Tabla 8. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, T1.....	36
Tabla 9. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, T2.....	36
Tabla 10. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS sin aireación, T3.....	36
Tabla 11. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T1. ....	40
Tabla 12. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T2. ....	40
Tabla 13. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T3. ....	41
Tabla 14. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T1.....	42
Tabla 15. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T2.....	43
Tabla 16. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T3.....	43
Tabla 17. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MMS. ....	44
Tabla 18. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T1. ....	50
Tabla 19. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T2. ....	50
Tabla 20. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T3. ....	50
Tabla 21. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T1.....	52
Tabla 22. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T2.....	52
Tabla 23. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T3.....	53
Tabla 24. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T1.....	54
Tabla 25. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T2.....	54
Tabla 26. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T3.....	55
Tabla 27. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP.....	55
Tabla 28. $\overline{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB sin aireación.....	58
Tabla 29. Valores de $r_n$ para <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB sin aireación. ....	59
Tabla 30. Valores de $r_n$ para <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB con aireación.....	63
Tabla 31. Resumen de los parámetros cinéticos promedio de <i>S. cerevisiae</i> en los medios de cultivo. ....	64

# CAPÍTULO I - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## 1.1 Introducción

Los nutrientes son sustancias químicas que engloban los glúcidos, lípidos, proteínas, elementos químicos esenciales (Ca, P, Mg, S, Fe y Se, entre otros), agua, electrolitos (Na, K, Cl) y vitaminas. Son requeridos por los organismos para la obtención de energía, y correcto desarrollo, mediante la construcción de componentes celulares y la regulación de procesos metabólicos (Cervera et al, 2004).

La biomasa microbiana ha sido considerada como una fuente conveniente para la sustitución de nutrientes de origen animal y vegetal, ya que en general, los microorganismos empleados tales como algas, levaduras y bacterias cuentan con un alto contenido proteico, con aminoácidos de alto valor biológico, así como de ácidos nucleicos (Gamboa et al, 2017).

Las levaduras fueron de los primeros microorganismos empleados para la obtención de proteína, en especial *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha sido la principal fuente de proteína unicelular (Single Cell Protein, SCP), con una producción de 200,000 toneladas de proteína seca anualmente (Chacón, 2004). La levadura *S. cerevisiae*, es considerada como GRAS (Generally Recognized As Safe) según la FDA (American Food and Drug Administration) (Zumbado et al, 2006), por lo que su empleo para la producción de biomasa es aceptable, ya que no representa algún efecto negativo en la salud del consumidor. Además, *S. cerevisiae* es un microorganismo facultativo dado que posee la capacidad para poder desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Para la producción de biomasa, se emplean sustratos que confieren la fuente de carbono a los microorganismos; éstos pueden ser de dos tipos: 1) fósiles y 2) renovables (Palmerín et al, 2011); siendo la segunda de mayor importancia, pues hoy en día se busca el empleo de técnicas sustentables, para satisfacer necesidades humanas sin afectar al medio ambiente. Unos de algunos ejemplos de fuentes de carbono renovables para el crecimiento de microorganismos son:

- Las frutas, como la papaya (*Carica papaya*), la cual es producida en áreas subtropicales y tropicales de todo el mundo debido a su alta demanda (Rivas, 2003).

Los parámetros cinéticos son valores que reflejan el comportamiento del crecimiento celular durante la fase exponencial en condiciones específicas (tipos de sustratos y condiciones de aireación); dichos parámetros abarcan:

- Velocidad de crecimiento celular,  $r_n$ : La velocidad a la que se reproduce el microorganismo.
- Velocidad de división promedio,  $\delta$ : El número de generaciones que se tienen a un tiempo determinado.
- Tiempo de duplicación celular,  $t_d$ : El tiempo en que el microorganismo se divide.
- Velocidad específica de crecimiento celular,  $\mu$ : La relación entre  $r_n$  y su respectiva concentración celular durante la fase exponencial.

## 1.2 Planteamiento del problema

Dado que la salud humana y animal dependen en gran parte de la nutrición, se han estudiado alternativas para la producción de nutrientes de forma sustentable; una de ellas es el uso de microorganismos no patógenos (en este caso *S. cerevisiae*) para el aprovechamiento de los nutrientes contenidos en su biomasa. El desarrollo de tales microorganismos está en función a factores de crecimiento, algunos de éstos son: los nutrientes, la temperatura y el pH del medio de cultivo, así como la presencia o ausencia de oxígeno.

Existen medios de cultivo definidos que favorecen el crecimiento de microorganismos específicos; sin embargo, son de costo elevado. Esto ha impulsado la investigación de medios de cultivo alternativos y de bajo costo, que favorezcan el crecimiento de los microorganismos. Con base en lo anterior, el estudio de medios de cultivo a base de sustratos de alta disponibilidad (*C. papaya*), han demostrado ser capaz de propiciar el crecimiento de *S. cerevisiae*.

De las fases de crecimiento de un microorganismo, la fase exponencial es la de mayor interés, dado que en ella se tiene la máxima reproducción celular (y con esto, el aumento en la cantidad de biomasa celular). Para estudiar dicha fase, se emplean los parámetros cinéticos, ya que permiten la evaluación del crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo específicos.

### 1.3 Justificación

Dada la búsqueda de fuentes nutritivas, se han estudiado alternativas para su producción sustentable; una de ellas es la producción de biomasa celular mediante el uso de medios de cultivo a base de sustratos de bajo costo (en comparación con los medios de cultivo definidos) y alta disponibilidad, ya que en la composición de dicha biomasa se encuentran nutrientes tales como carbohidratos, lípidos, y proteínas que son capaces de ser aprovechados por los seres humanos y los animales.

*S. cerevisiae* es un microorganismo de fácil manipulación y de rápido crecimiento; es utilizado para la producción de alimentos como el pan y bebidas alcohólicas (Jamieson, 1992). Por otra parte, su biomasa es aceptada para consumo humano y animal, dado que este microorganismo es considerado GRAS por la FDA. La biomasa celular es entonces, una fuente alternativa de proteínas, las cuales pueden sustituir algunas de consumo tradicional, como lo son las proteínas de origen animal y vegetal (Chacón, 2004). Además, *S. cerevisiae* puede ser cultivado en medios de cultivo con y sin aireación, dado que es un microorganismo aerobio facultativo; estas características permiten entonces, evaluar la eficiencia de su desarrollo en ambas condiciones.

Para el estudio del crecimiento de *S. cerevisiae*, se empleó el medio de cultivo a base de:

- Papaya (*C. papaya*), por ser una de las frutas más producidas en México, siendo Veracruz, el estado con el quinto lugar de su producción a nivel nacional.

Este sustrato renovable posee nutrientes que favorecen el crecimiento de microorganismos, tales como azúcares y compuestos nitrogenados; esto representa una alternativa en el uso de medio de cultivo definido.

Por lo tanto, se evalúa el crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo mencionado, con y sin aireación, mediante el uso del medio mínimo de sales como medio de cultivo de control y los parámetros cinéticos, que muestran detalladamente el comportamiento del crecimiento celular en las condiciones en que se desarrolla el microorganismo, con el fin de analizar la eficiencia del crecimiento celular y a su vez, la factibilidad de la producción de biomasa celular.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio de cultivo a base de *C. papaya*, con y sin aireación, como indicadores de la eficiencia de su crecimiento.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio de cultivo a base de *C. papaya* y medio mínimo de sales, con y sin aireación.
- Analizar el crecimiento de *S. cerevisiae* en los medios de cultivo mencionados cuando se suministra aire, mediante la comparación de los parámetros cinéticos de dicho microorganismo.
- Comparar el crecimiento de *S. cerevisiae* en los medios de cultivo a base de *C. papaya*, tomando como referencia los parámetros cinéticos correspondientes al medio mínimo de sales, tanto en condición aerobia como anaerobia.
- Evaluar el crecimiento de *S. cerevisiae* a base de *C. papaya* en el Biorreactor del ITSM, y comparar los parámetros cinéticos con el medio mínimo de sales.

## **1.5 Hipótesis**

Mediante la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en diferentes condiciones metabólicas (medio de cultivo a base de *C. papaya*, con y sin aireación), es posible determinar la eficiencia de su crecimiento.

## 1.6 Alcances

La evaluación del crecimiento de *S. cerevisiae* involucra la obtención y análisis de los parámetros cinéticos; para ello es necesaria la elaboración de los medios de cultivo a base de *C. papaya* y medio mínimo de sales, así como el monitoreo de la concentración celular de dicho microorganismo en los medios de cultivo mencionados, con y sin aireación.

El desarrollo experimental se realizó en el laboratorio de Ingeniería Bioquímica del ITSM, debido a que en sus instalaciones se cuenta con el espacio adecuado para alojar el equipo de agitación y aireación de los medios de cultivo en los que se desarrolla *S. cerevisiae*, así como para realizar los conteos celulares.

## 1.7 Limitaciones

A pesar que la biomasa es un producto de importancia, la cantidad obtenida al término de cada experimento fue mínima, por este motivo se omite el análisis de la cantidad generada en los medios de cultivo estudiados; en su lugar, se emplea la concentración celular máxima obtenida ( $C_{n_{\max}}$ ) como parámetro cinético, para mostrar indirectamente la cantidad máxima de biomasa generada.



## CAPÍTULO II - MARCO TEÓRICO

### 2.1 Levaduras

#### 2.1.1 Generalidades

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es considerada como el microorganismo más usado por el ser humano a través de los años, pues ha sido empleado para la elaboración de muchos alimentos, siendo algunos ejemplos el pan y las bebidas alcohólicas (Aranda et al, 2004).

Algunas levaduras se forman sobre los medios de cultivo como colonias pastosas, las cuales se constituyen por células aisladas que suelen estar en forma esférica, ovoide, elipsoide o alargada (ver figura 1); unas pocas pueden presentar hifas. Algunas pueden medir de 1 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2 a más 20  $\mu\text{m}$  de longitud; esto depende de la especie y edad del microorganismo, así como de la nutrición y algunos otros factores.

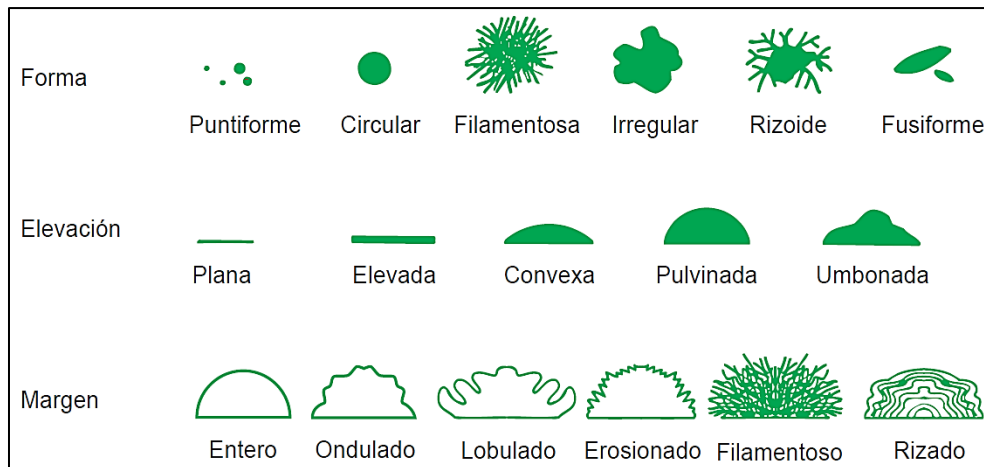


Figura 1. Morfología de colonias microbianas (Prescott et al, 2002).

Las levaduras son microorganismos aerobios; muchas especies son fermentadoras, algunas otras no, como por ejemplo los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotirula*. Las levaduras pueden llegar a fermentar algunos pocos glúcidos, principalmente hexosas y disacáridos. Los microorganismos del género *Saccharomyces*, son fermentadores energéticos de los azúcares bajo condiciones anaerobias (sin oxígeno). *Dekkera*, su anamorfo *Brettanomyces* y algunas otras, llegan a fermentar la glucosa mucho más rápido en aerobiosis (Carrillo et al, 2007).

Los primeros microorganismos más utilizados como fuente de proteína fueron las levaduras, destacando *S. cerevisiae*; dicho microorganismo es, hasta el día de hoy, la principal fuente de proteína unicelular, la cual es obtenida de su biomasa (Suarez et al, 2016).

### **2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae***

La levadura *S. cerevisiae* constituye el grupo de microorganismos más profundamente asociado al progreso y bienestar de los seres humanos; su nombre se deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene su energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. También puede aislarse con facilidad en plantas y en la tierra, así como en el tracto gastrointestinal y genital humano.

Esta levadura es utilizada en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos, así como de alcohol. La levadura inactivada por temperatura, se usa como fuente de nutrientes en la alimentación animal y humana, consumiéndose directamente, al igual que algunos de sus derivados.

*S. cerevisiae* es una levadura considerada como microorganismos GRAS, por lo que se ha llegado a emplear como aditivo alimentario. Se ha analizado que la crema de la levadura *S. cerevisiae* concentrada, alcanza valores de materia seca (MS) de 18 a 20%, con un contenido de proteína bruta (PB) de 32 a 36% sobre base seca (se llegaron a registrar valores inferiores a 39%).

### **2.1.3 Recuperación de levadura**

Durante el proceso de la fermentación, *S. cerevisiae* se desarrolla factiblemente, reproduciéndose y generando más células (producto valioso); este microorganismo puede emplearse como alimento animal (en crema seca) o recuperarse para recircularla al proceso e iniciar de nuevo la fermentación. La calidad de la levadura recuperada depende del modo en que se lleve a cabo el proceso fermentativo, así como de su manejo durante operaciones que la involucren.

### **2.1.4 Factores de crecimiento y desarrollo de la levadura**

a) **Presión osmótica:** La alimentación de la levadura es un proceso prácticamente osmótico; es importante evitar que los medios de cultivo sean hipertónicos o

hipotónicos, puesto que podría darse lugar a plasmoptosis y la plasmólisis de las células. El estrés osmótico puede llegar a causar la disminución en el volumen celular, afectando al mismo tiempo, la velocidad de la fermentación, así como la viabilidad celular.

- b) Temperatura:** Temperaturas elevadas ocasionan la disminución de la biomasa celular; esto es producto del descenso en el contenido de las proteínas y el ácido ribonucleico (ARN). El ácido desoxirribonucleico (ADN) y los aminoácidos que se encuentran libres, inducen la rigidez de la membrana celular. Temperaturas muy bajas pueden llegar a provocar un estado de latencia en las células, deteniendo así su crecimiento.
- c) Desecación:** Es uno de los principales agentes que inhiben las actividades y desarrollo de los microorganismos.
- d) Luz:** En general, la luz es perjudicial para los microorganismos que carecen de clorofila, o cualquier otro pigmento que les permita usar la energía de las radiaciones en el proceso de fotosíntesis.
- e) pH:** El pH óptimo en el cual se pueden desarrollar los microorganismos, oscila entre 4 y 5. Las levaduras poseen una gran ventaja, al soportar medios más ácidos que otros microorganismos; esta característica ha sido aprovechada en los procesos industriales, evitando así, el crecimiento de bacterias que compitan por los nutrientes contenidos en el medio de cultivo.
- f) Alcohol:** El efecto del etanol en la célula es una combinación de inhibición (anulación) del crecimiento y la disminución de la viabilidad (capacidad de reproducción); puede llegar a actuar como inhibidor de la fermentación a partir del 8% en volumen. Se ha determinado que no es recomendable terminar la fermentación con un grado de alcohol muy elevado (Suarez et al, 2016).

## **2.2 Medio mínimo de sales (MMS)**

El medio mínimo de sales es un medio de cultivo químicamente definido, empleado generalmente para el crecimiento de microorganismos poco exigentes nutricionalmente (Aquiahuatl et al, 2004). Dicha composición (ver tabla 1) representa una ventaja para ser utilizado como medio de cultivo de control, y evaluar el crecimiento de microorganismo específicos (tal es el caso de la levadura *S. cerevisiae*) en determinados medios de cultivo.

Los componentes de éste medio de cultivo se resumen en sales y una fuente de carbono (glucosa); dichos nutrientes son los mínimamente requeridos por los microorganismos para propiciar su desarrollo.

Componente	g/L
Glucosa	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
pH	6.5-7.0

### 2.3 *Carica papaya*

La papaya (*C. papaya*) pertenece a la familia *Caricaceae*, género *Carica* (Badillo, 2002). Es una planta herbácea, un árbol pequeño con tallo único (raras veces ramificado) y frondoso en la parte superior (ver figura 2). Su fruto se conoce comúnmente como papaya, papayón y olocotón; es una fruta tropical con forma oval a periforme, perfumada, de sabor dulce y muy jugosa (Gómez et. al, 2008).



Figura 2. *Carica papaya* (Koehler, 1887).

La papaya es un fruto climatérico, es decir, sigue madurando tras su cosecha. El estado climatérico es un estado de auto estimulación, en el cual se produce un cambio de crecimiento a envejecimiento de los frutos, observándose un incremento repentino en la actividad respiratoria, así como cambios bioquímicos iniciados por la producción auto catalítica de etileno (Badillo, 2002). Con este fruto se preparan purés, jugos, mermeladas, gelatinas, dulces, almíbar, entre otros productos (Upadhyay, 2014; Kurozawa, 2014).

El papayo es nativo de los trópicos americanos; es cultivado en áreas subtropicales y tropicales de todo el mundo debido a la alta demanda de su fruto, así como para la extracción de papaína (Rivas, 2003). La papaya es la tercera fruta tropical más consumida en el mundo, y por el dinamismo en su comercialización es considerada una de las más importantes económicamente. México ocupa el sexto lugar como productor mundial con 712,917 toneladas, de las cuales una quinta parte de la producción se destina al mercado exterior. Estados Unidos de América es el principal mercado de papaya producida en México (Evans y Vallen, 2012; SAGARPA, 2013).

Cabe resaltar que, en México los estados productores más importantes de este fruto son: Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Colima, Guerrero y Michoacán, los cuales aportaron el 79% del volumen total (SIAP, 2014).

### **2.3.1 Propiedades**

*C. papaya* es muy apreciada por sus propiedades nutritivas y delicioso sabor. Es ideal para regímenes (dietas), por contener vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y niacina o B<sub>3</sub>, todas del Complejo B, mismas que regulan el sistema nervioso y el aparato digestivo, fortifican el músculo cardíaco, protegen la piel y el cabello; dichas vitaminas son esenciales para el crecimiento. Contiene también vitaminas A y C, es rica en minerales como calcio, fósforo, magnesio, hierro, azufre, silicio, sodio y potasio (Rivera et al, 2010).

La papaya es conocida como fruta de consumo, tanto en forma directa como en jugos y dulces; tiene magníficas propiedades para facilitar la digestión de alimentos de difícil asimilación, debido a su alto contenido de papaína. De dicha enzima, se producen más de 1,000 toneladas anuales en el mundo entero; se utiliza en la fabricación de cerveza, cosméticos e industria alimenticia (Netsuwan, 2013). La papaína degrada las proteínas y acelera el proceso digestivo. Son conocidas también sus propiedades antiácidas y laxantes. Dado su bajo aporte calórico, es muy utilizada en dietas de adelgazamiento (Badillo, 2002).

Este fruto es usualmente consumido crudo, sin cáscara ni semillas; en estado verde (inmaduro), puede ser consumido en ensaladas y estofados. Posee una cantidad relativamente alta de pectina, la cual puede ser usada para preparar mermeladas. En algunas partes del mundo, las hojas de papaya son utilizadas como té para el tratamiento contra la malaria; sin embargo, se desconoce su mecanismo y no se ha demostrado científicamente.

### **2.3.2 Composición química**

Gómez et al (2008), analizaron cuatro cultivares de *C. papaya* sin llegar a la madurez, enfocándose en el contenido en azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y minerales. El contenido de humedad varió de 87 a 94%, los carbohidratos de 2 a 12% (sacarosa 7-50%, glucosa 14-78% y fructosa 13-50% del contenido total de carbohidratos). La materia seca aumentó un 7% a los 15 días de la formación del fruto, y 13% tras la cosecha. Durante este período, hay una débil disminución del contenido de sólidos insolubles en alcohol, almidón y algunos minerales; a su vez, se presenta un aumento en la cantidad de azúcares. La concentración de ácidos varía mucho durante la maduración del fruto. El contenido de hierro aumentó durante el desarrollo del fruto, mientras que el potasio, fósforo y calcio no sufrieron cambios significativos. El contenido de las vitaminas A y C aumentó durante la maduración (al igual que las proteínas).

El cambio más significativo que ocurre en la maduración del fruto es la aparición de azúcares solubles en *C. papaya*. Los polisacáridos se metabolizan en azúcares, por lo que incrementa el dulzor. El azúcar predominante en *C. papaya* madura es sacarosa (48.3%), seguido de glucosa (29%) y fructosa (21 %), y trazas de pseudoheptulosa (Rivas, 2003). El enzima que cataliza la inversión de sacarosa (rompimiento de dicha molécula para dar lugar a glucosa y fructosa),  $\beta$ -fructofuranosidasa, también está presente (Chan y Kwok, 1975). Al ser más elevado el contenido en azúcares que en ácidos, el sabor dulce predomina. La acidez titulable aumenta a medida que el fruto madura a 24 °C, pero una vez alcanzada, disminuye. El contenido en ácidos orgánicos de la papaya madura es más bajo que el de otras frutas y esto contribuye a su agradable sabor dulce.

A diferencia de la mayoría de las frutas, *C. papaya* aumenta el contenido de vitamina C a medida que se desarrolla, alcanzándose el máximo valor en la madurez (55 mg/100 g de producto comestible). El mineral más abundante encontrado en este fruto es el potasio, que

se suele encontrar combinado con algunos ácidos orgánicos (Upadhyay, 2013). Netsuwan (2013) determinó que la calidad organoléptica, el perfil de compuestos volátiles y el contenido lipídico dependían del estado de madurez del fruto.

En la tabla 2 se muestra la proporción de los componentes principales de *C. papaya* correspondientes a 100 g de fruto.

Carbohidratos	10.82 g
Azúcares	7.82 g
Fibra alimentaria	1.5 g
Grasas	0.26 g
Proteínas	0.47 g
Tiamina (vit. B1)	0.023 mg
Riboflavina (vit. B2)	0.027 mg
Niacina (vit. B3)	0.357 mg
Ácido pantoténico (vit. B5)	0.191 mg
Ácido fólico (vit. B9)	37 µg
Fósforo	14 mg

## 2.4 Crecimiento celular

### 2.4.1 Curva de crecimiento celular

Las colonias de microorganismos raramente tienen un crecimiento exponencial prolongado; si esto llegara a ocurrir en un determinado tiempo o muy poco tiempo, la tierra estaría totalmente cubierta por una masa de microorganismos, mayor que la de la misma tierra. El crecimiento normalmente está limitado por el metabolismo microbiano; la principal consecuencia es que, al cabo de un cierto tiempo, el crecimiento llega a disminuir hasta detenerse (ver la fase exponencial en la figura 3). Cuando se realiza el monitoreo del crecimiento de un microorganismo en particular, se realizan este tipo de gráficas (curva de crecimiento celular); generalmente se analiza la fase exponencial, dado que en ella los microorganismos se reproducen rápidamente hasta agotar los nutrientes presentes (se presenta el mayor incremento en la población celular).

## 2.4.2 Fases del crecimiento celular

En la figura 3, se muestran las cuatro fases típicas del crecimiento microbiano:

1. Fase de latencia
2. Fase exponencial
3. Fase estacionaria
4. Fase de muerte

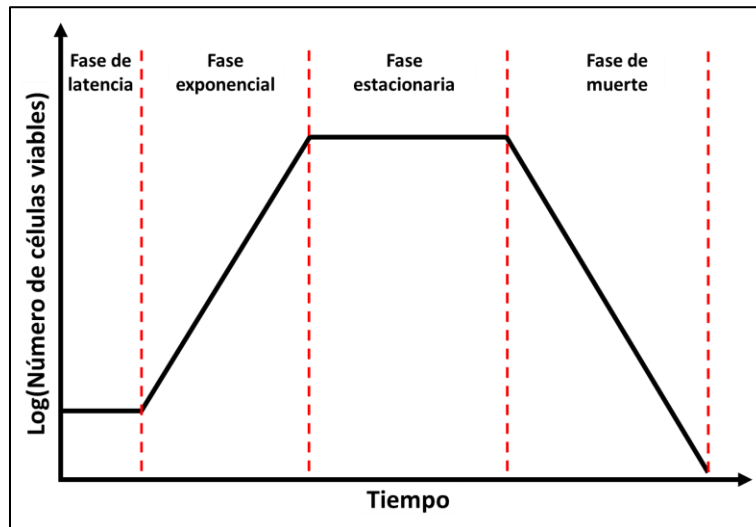


Figura 3. Curva de proliferación típica de una población microbiana (Fuente: elaboración propia).

- 1) **Fase de retardo o de latencia:** Existe un aparente retardo en el aumento de la población celular; durante esta fase, las células sintetizan enzimas para llevar a cabo las actividades metabólicas necesarias. Cuando se monitorea la concentración celular durante esta fase, los valores no presentan cambios significativos.

El microorganismo se prepara para que los nutrientes puedan ser absorbidos adecuadamente; durante esta fase, el microorganismo se adapta al medio y aumenta la masa celular (tamaño de células) pero no la población celular (número de células). El tiempo de latencia del microorganismo depende de las condiciones en las que se encuentre el inóculo (células a reproducir), es decir, el tiempo que ha permanecido dentro del medio de cultivo (dado que disminuye la cantidad de nutrientes y se acumulan productos tóxicos); por este motivo, se llega a decir que los inóculos viejos alargan la fase de latencia del microorganismo a cultivar.



- 2) **Fase exponencial:** El microorganismo entra en la fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de crecimiento llega a ser la máxima. La velocidad de crecimiento que llega a alcanzar un cultivo, depende del tipo de microorganismo, así como de los factores de crecimiento (intrínsecos y extrínsecos al medio de cultivo) tales como la temperatura, el pH, la oxigenación, etc. En la mayoría de los casos, esta fase presenta una tendencia lineal; gracias a esto se han desarrollado modelos matemáticos para el estudio del crecimiento de los microorganismos.
- 3) **Fase estacionaria:** Al final de la fase exponencial, la velocidad de crecimiento comenzará a disminuir hasta hacerse nula; es entonces cuando el microorganismo llega a la fase estacionaria, ya que la composición del medio de cultivo se ha modificado (cambios en la concentración de oxígeno presente o de pH) y la concentración de nutrientes ha disminuido; esto desencadena la regulación de la actividad enzimática. Se acumulan productos metabólicos que pueden ser tóxicos para el cultivo celular. En esta fase se llegan a equilibrar el número de las células nuevas con las células que mueren.
- 4) **Fase de decadencia o de muerte:** Al final de la fase estacionaria, el microorganismo comienza la fase de muerte, en la cual el número de células comienza a disminuir (las células comienzan a morir). La pendiente de esta fase puede ser más o menos pronunciada; esto depende del microorganismo en cuestión.

### 2.4.3 Métodos de medición del crecimiento

El aumento de la población celular se determina mediante mediciones sucesivas en tiempos determinados; existen varias maneras para determinar la población microbiana:

- a) **Conteo directo en microscopio:** Es el método más común y rápido; consiste en contar las células presentes en un volumen determinado. Para que estos recuentos puedan llevarse a cabo, generalmente se utilizan las cámaras de recuento, también conocidas como cámaras de Neubauer (ver figura 4). Una de las mayores ventajas de dichas cámaras es que brindan información adicional sobre el tamaño real y la morfología de los objetos contados. La muestra que contiene al microorganismo puede utilizarse tal cual, siempre y cuando se encuentre en estado líquido; también se pueden preparar diluciones (tanto para muestras líquidas como sólidas).

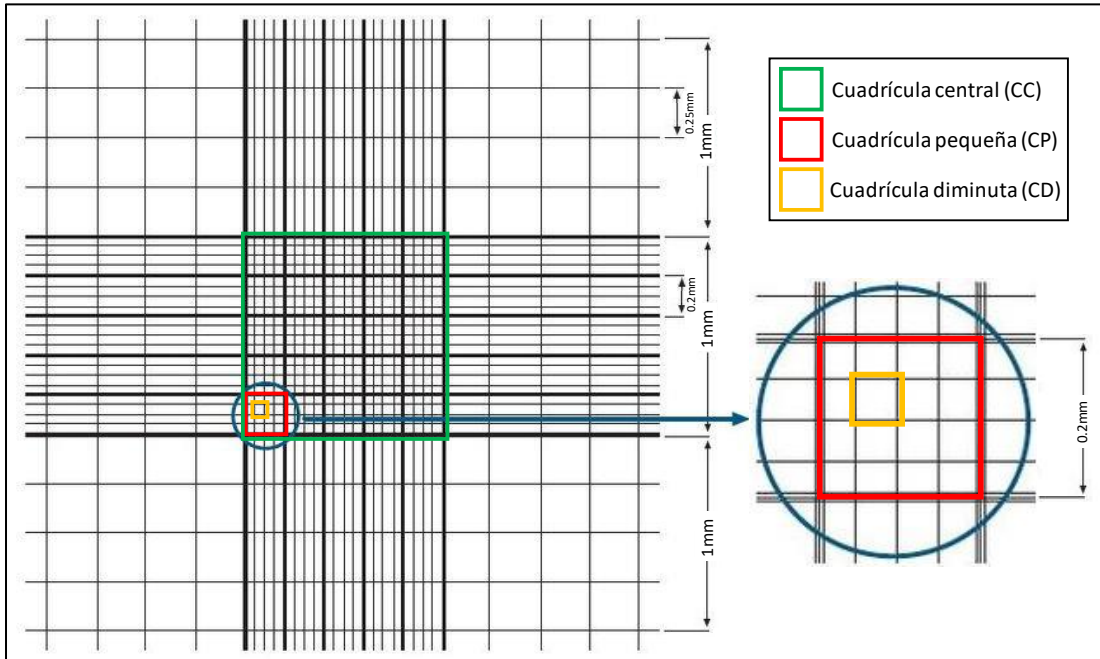


Figura 4. Cámara de Neubauer observada en el microscopio (Fuente: elaboración propia).

El conteo celular en cámara de Neubauer, se basa en conocer el número de células en un volumen de muestra. Con base en la figura 4, el volumen de muestra se determina de la siguiente manera: La cuadrícula central (CC) está dividida en 25 cuadros pequeños (CP) (cada uno de  $0.2 \times 0.2$  mm), cada uno dividido en  $4 \times 4$  cuadros diminutos (CD); el área de CC es de  $1 \text{ mm}^2$ , mientras que el espacio entre dicha área y el cubreobjetos es de  $0.1 \text{ mm}$ , lo cual da como resultado un volumen de conteo de  $0.1 \text{ mm}^3$ , o bien,  $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ . Para el conteo celular en cuadro chico (en CC) se consideran las células que se encuentren dentro de cada CD, así como aquellas que toquen sus bordes izquierdo e inferior (conteo en forma de L); para la determinación de la concentración celular ( $C$ ) se emplea la siguiente fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot D$$

Donde:

- $C$ : Concentración celular, cel/ml.  
Indica el número de células presentes en un mililitro de muestra.
- $N$ : Promedio de células presentes en  $1 \text{ mm}^2$ , cel.

Si se cuentan las células presentes en los cuadros CP central y extremos de CC, el valor de  $N$  será la división de la suma total de dichas células entre los 5 cuadros CP contados.

$10^4$  : Constante, unidad de volumen para el área contada ( $1 \text{ mm}^2$ ),  $\text{ml}^{-1}$ .

Dado que las unidades de  $C$  son cel/ml, deberá dividirse  $N$  entre el volumen de muestra para  $1 \text{ mm}^2$ , es decir, entre  $10^{-4} \text{ ml}$ , o bien, multiplicar  $N$  por  $10^4 \text{ ml}^{-1}$ .

$D$ : Factor de dilución empleado para realizar el conteo celular.

Por ejemplo, si se realizó una dilución con 1ml de muestra y 2ml de agua sin células, el valor de  $D$  será 3.

**b) Conteo de células viables:** Este método se basa en que el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias; el método puede hacerse con medios sólidos o líquidos.

• **Conteo en placas o cajas Petri:** Este método permite determinar solo las células microbianas viables en las condiciones de crecimiento estudiadas (nutrientes, atmósfera, temperatura, entre otros). Para esto, se siembra una cantidad conocida de la suspensión microbiológica en el medio de cultivo sólido.

En un medio sólido, cada bacteria se llegará a multiplicar formando una colonia visible capaz de ser contada a simple vista. Ya que las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término llamado: Unidades Formadoras de Colonias (UFC); esto puede ser una desventaja ya que si dos bacterias no se separan darán una sola colonia, llegando a subestimar de esta forma el número de microorganismos en la suspensión.

Considerando que todas las células presentes en una placa dispongan de los nutrientes, y que los errores en la metodología sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando se desarrollan entre 30 y 300 colonias.

• **Determinación del Número Más Probable (NMP):** Algunas bacterias son difíciles de contar en los medios sólidos; para esto se recurre a esta técnica, la cual se basa en la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo (capaz de reproducirse o de producir una determinada reacción en el medio) en varias cantidades de muestra. Para determinar el NMP de un microorganismo, se tiene que diluir la muestra hasta que se tenga una densidad menor a 1 célula por cada mililitro de diluyente.

La interpretación de los resultados se hace con base en una distribución estadística, y en general se emplean tablas preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos (teniendo en cuenta la dilución que se observa la proliferación de los microorganismos).

Este método se emplea para los recuentos microbianos de nitratores por la dificultad en la visualización de las colonias en los medios sólidos. Es útil para determinar cargas microbianas bajas, menores a 10 por gramo, así como para cargas mayores utilizando las diluciones adecuadas. Se prefiere este método cuando los microorganismos son de muy lento crecimiento, o cuando han sido sometidos a condiciones adversas, por ejemplo: altas temperaturas, desecación, cambios en el pH, etc.

**c) Otros métodos para poder contar:**

- **Determinación de adenosín trifosfato (ATP):** Es un método que permite determinar indirectamente la masa microbiana de una población. Se considera que la proporción de ATP encontrado en una muestra es proporcional con respecto a las células vivas.

- **Recuento electrónico:** Los contadores electrónicos permiten realizar recuentos de bacterias o levaduras no filamentosas, así como protozoarios, pero no el de los hongos, ni microorganismos filamentosos o micelares. Este instrumento consta de electrodos que llegan a medir la resistencia eléctrica del sistema. Un volumen fijo de una suspensión de un microorganismo es forzado a pasar desde un compartimiento al otro a través del pequeño conducto. Cuando pasa un microorganismo, la resistencia al pasar de una corriente eléctrica se incrementa debido a que la conductividad del microorganismo es menor que la del medio. Estos cambios en la resistencia son convertidos en pulsos y son contados.

Este tipo de recuentos presentan algunas desventajas, ya que no pueden medirse los pulsos en soluciones muy concentradas de microorganismos, debido a que el paso de más de una célula en un breve periodo de tiempo, será considerado como una célula más grande, y es común la obstrucción del orificio debido a los microorganismos de gran tamaño (Brock et al, 1993).

## 2.5 Parámetros cinéticos

La concentración celular ( $C_n$ ) hace referencia al número de células presentes en un volumen de muestra conocido. En consecuencia, la tasa de crecimiento celular puede definirse de varias maneras diferentes, tales como:

$\frac{dC_n}{dt}$  = Cambio de concentración celular respecto al tiempo ( $cel/ml \cdot h$ )

$r_n$  = Velocidad de crecimiento celular ( $cel/ml \cdot h$ )

$n$  = Numero de generaciones

$\delta$  = Velocidad de división promedio ( $h^{-1}$ )

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )

$t_d$  = Tiempo de duplicación ( $h$ )

Los valores de  $dC_n/dt$  y  $r_n$  son iguales sólo cuando el microorganismo se cultiva en un fermentador por lotes, debido a que el microorganismo se desarrolla en un sistema cerrado (sin entrada ni salida de materia, a excepción del aire filtrado) y su crecimiento depende de la concentración de sustrato inicial (la cual disminuye con el paso del tiempo, hasta agotarse totalmente). Cuando el cultivo del microorganismo es en un fermentador de operación continua (sistema abierto), el crecimiento no se ve afectado por la concentración de sustrato inicial dado que permanece constante; por este motivo, dicho crecimiento se ve afectado por factores tales como el flujo volumétrico del medio de cultivo, el tiempo de residencia del cultivo y otras condiciones operativas. Por lo tanto, en operación continua  $dC_n/dt$  y  $r_n$  no son iguales (ya que intervienen factores externos).

La velocidad de crecimiento celular basada en el número de células ( $r_n$ ) y la que se basa en el peso celular ( $r_x$ ) no son necesariamente las mismas, porque el tamaño promedio de las células puede variar considerablemente de una fase a otra (de fase líquida a fase sólida). Cuando la masa de una célula individual aumenta sin división, la tasa de crecimiento basada en el peso celular aumenta, mientras que la que se basa en el número de células permanece igual.

A veces la velocidad de crecimiento es confundida con la velocidad de división, por lo que ésta última se define como la tasa de división celular por unidad de tiempo, es decir, qué tanto se ha dividido la célula en un tiempo determinado o bien, el número de generaciones producidas por unidad de tiempo.

## 2.5.1 Determinación de los parámetros cinéticos

### 2.5.1.1 Número de generaciones ( $n$ ):

Si después de un tiempo inicial  $t_0 = 0$ , todas las células contenidas en un matraz (número de células inicial  $Cn_0$ ) se han dividido después de un cierto período de tiempo ( $t$ ), la población celular habrá aumentado a  $Cn_0 \cdot 2^n$ , ya que la división celular da origen a dos células hijas. Si las dos células generadas se dividen  $n$  veces después del tiempo  $t$ , el número total de células (número de células final  $Cn$ ) será

$$Cn = Cn_0 \cdot 2^n .$$

Para despejar  $n$  de la ecuación anterior, pueden emplearse algunas estrategias:

#### 1) Aplicar $\log_{10}$ :

$$Cn = Cn_0 \cdot 2^n$$

$$\log_{10} [ Cn = Cn_0 \cdot 2^n ]$$

$$\log_{10} ( Cn ) = \log_{10} ( Cn_0 \cdot 2^n )$$

$$\log_{10} ( Cn ) = \log_{10} ( Cn_0 ) + \log_{10} ( 2^n )$$

$$\log_{10} ( Cn ) = \log_{10} ( Cn_0 ) + n \cdot \log_{10} ( 2 )$$

$$n \cdot \log_{10} ( 2 ) = \log_{10} ( Cn ) - \log_{10} ( Cn_0 )$$

$$n = \frac{\log_{10} ( Cn ) - \log_{10} ( Cn_0 )}{\log_{10} ( 2 )}$$

$$\boxed{n = \frac{\log_{10} ( Cn ) - \log_{10} ( Cn_0 )}{0.301}} \quad (1)$$

## 2) Aplicar $\log_2$ :

$$\begin{aligned} Cn &= Cn_0 \cdot 2^n \\ \log_2 [Cn &= Cn_0 \cdot 2^n] \\ \log_2 (Cn) &= \log_2 (Cn_0 \cdot 2^n) \\ \log_2 (Cn) &= \log_2 (Cn_0) + \log_2 (2^n) \\ \log_2 (Cn) &= \log_2 (Cn_0) + n \cdot \overbrace{\log_2 (2)}^1 \\ \log_2 (Cn) &= \log_2 (Cn_0) + n \\ \boxed{n = \log_2 (Cn) - \log_2 (Cn_0)} & \quad (2) \end{aligned}$$

### 2.6.1.2 Velocidad de división promedio ( $\delta$ ).

Indica el número de generaciones ( $n$ ) producidas por unidad de tiempo ( $t$ ); matemáticamente se expresa de la siguiente manera:

$$\delta = \frac{n}{t}. \quad (3)$$

La velocidad de división promedio puede representarse de dos maneras, dependiendo de la forma en que se exprese  $n$ :

#### Representación 1

Sustituyendo  $n$  (ecuación 1) en la ecuación 3, se tiene que:

$$\begin{aligned} \delta &= \frac{\log_{10} (Cn) - \log_{10} (Cn_0)}{0.301 \cdot t} \\ \boxed{\delta = \frac{\log_{10} (Cn) - \log_{10} (Cn_0)}{0.301 \cdot t}} & \quad (4) \end{aligned}$$

#### Representación 2

Sustituyendo  $n$  (ecuación 2) en la ecuación 3, se tiene que:

$$\boxed{\delta = \frac{\log_2 (Cn) - \log_2 (Cn_0)}{0.301 \cdot t}}$$

Si el tiempo final es el tiempo de duplicación ( $t = t_d$ ), entonces el número de células finales será el doble del número de células iniciales:

$$Cn = 2 \cdot Cn_0 .$$

Dicho esto, se sustituye  $Cn$  y  $t$  en la ecuación 4:

$$\delta = \frac{\log_{10}(2 \cdot Cn_0) - \log_{10}(Cn_0)}{0.301 \cdot t_d}$$

$$\delta = \frac{\log_{10}(2) + \log_{10}(Cn_0) - \log_{10}(Cn_0)}{0.301 \cdot t_d}$$

$$\delta = \frac{\log_{10}(2)}{0.301 \cdot t_d} \quad (5)$$

$$\delta = \frac{0.301}{0.301 \cdot t_d}$$

$$\boxed{\delta = \frac{1}{t_d}} \quad (6)$$

### 2.5.1.3 Tiempo de duplicación ( $t_d$ ).

El tiempo de duplicación indica el tiempo en el cual se produce una generación de microorganismos; para calcularlo, se despeja de la ecuación 6:

$$\boxed{t_d = \frac{1}{\delta}}$$

A partir de la ecuación 5, se despeja  $t_d$  :

$$t_d = \frac{\log_{10}(2)}{0.301 \cdot \delta};$$

se sabe por bibliografía que

$$0.301 \cdot \delta = \mu ,$$

por lo tanto

$$\boxed{t_d = \frac{\log_{10}(2)}{\mu}}$$



#### 2.5.1.4 Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ).

##### Representación 1:

Se sabe que la velocidad de crecimiento celular es el cambio de la concentración celular respecto al tiempo en el caso del cultivo de microorganismos en un fermentador por lotes, por lo que matemáticamente se denota de la siguiente manera:

$$r_n = \frac{d(Cn)}{dt}. \quad (7)$$

Integrando la ecuación 7 se tiene que

$$\begin{aligned} r_n \cdot dt &= d(Cn) \\ r_n \int_0^t dt &= \int_{Cn_0}^{Cn} d(Cn) \\ r_n \cdot t &= Cn - Cn_0; \end{aligned}$$

de la última expresión, se despeja  $Cn$  :

$$\boxed{\begin{matrix} Cn = r_n \cdot t + Cn_0 \\ y \quad b_1 \quad x \quad b_0 \end{matrix}}. \quad (8)$$

La ecuación 8 obedece el modelo de la ecuación general para una línea recta; de la cual, la pendiente ( $b_1$ ) indica directamente el valor de  $r_n$  .

##### Representación 2:

Es importante mencionar que  $r_n$  puede expresarse con la siguiente forma:

$$r_n = \mu \cdot Cn .$$

La expresión anterior es una ecuación de velocidad de primer orden, ya que la velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ) depende de un solo factor, la concentración celular ( $Cn$ ), el cual se multiplica por un factor de proporcionalidad ( $\mu$ ).

#### 2.5.1.5 Velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ).

La velocidad específica de crecimiento celular puede representarse de la siguiente forma.

$$\mu = \underbrace{\frac{d(Cn)}{dt} \cdot \frac{1}{Cn}}_{(9)} = \underbrace{\frac{d(\ln(Cn))}{dt}}_{(10)} .$$

La igualdad anterior puede comprobarse desarrollando las ecuaciones 9 y 10. Partiendo de la ecuación 9, se resuelve la ecuación diferencial de la siguiente manera:

$$\mu = \frac{d(Cn)}{dt} \cdot \frac{1}{Cn}$$

$$\mu \cdot dt = \frac{d(Cn)}{Cn};$$

integrando la expresión anterior, se obtiene la ecuación 11:

$$\mu \int_0^t dt = \int_{Cn_0}^{Cn} \frac{d(Cn)}{Cn}$$

$$\boxed{\mu \cdot t = \ln(Cn) - \ln(Cn_0)} \quad (11)$$

Partiendo de la ecuación 10, se resuelve la ecuación diferencial de la siguiente manera:

$$\mu = \frac{d(\ln(Cn))}{dt}$$

$$\mu \cdot dt = d(\ln(Cn));$$

integrando la expresión anterior, se obtiene la ecuación 12:

$$\mu \int_0^t dt = \int_{Cn_0}^{Cn} d(\ln(Cn))$$

$$\boxed{\mu \cdot t = \ln(Cn) - \ln(Cn_0)} \quad (12)$$

Dado que las ecuaciones 11 y 12 son idénticas, se demuestra que las ecuaciones 9 y 10 pueden ser empleadas para representar a  $\mu$ .

Partiendo de la ecuación 11, se despeja  $\ln(Cn)$ ; esto da como resultado la siguiente ecuación:

$$\boxed{\underbrace{\ln(Cn)}_y = \underbrace{\mu}_{b_1} \cdot \underbrace{t}_x + \underbrace{\ln(Cn_0)}_{b_0}},$$

de la cual, la pendiente ( $b_1$ ) indica directamente el valor de  $\mu$ .

### CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo a base de *Carica papaya*, y medio mínimo de sales, con y sin aireación, se planteó y llevó a cabo la siguiente metodología (ver figura 5).

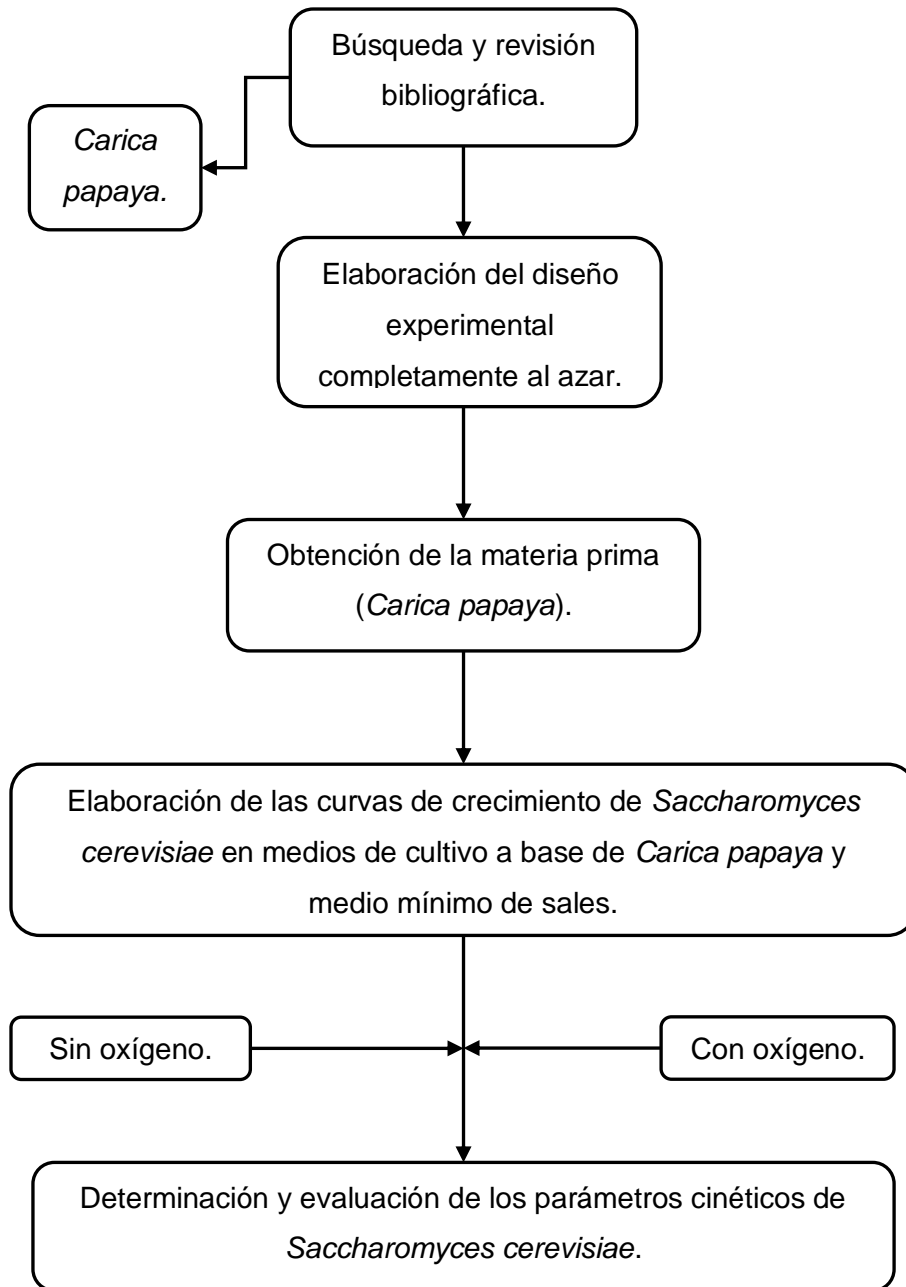


Figura 5. Esquema general del trabajo.

### 3.1 Búsqueda y revisión bibliográfica

Se investigaron referencias acerca del crecimiento de *S. cerevisiae* en medios de cultivo a base de *C. papaya*, para identificar la composición de dichos medios. De esta manera, se tomaron como base las mejores condiciones en las que se desarrolló dicho microorganismo.

### 3.2 Elaboración del diseño experimental completamente al azar

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente (Román, 2004). Para la elaboración del diseño experimental completamente al azar, se decidió evaluar el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio de cultivo a base de *C. papaya* y medio mínimo de sales (dos medios de cultivo), con y sin aireación (dos formas de airear), haciendo tres replicas para cada condición. El análisis anterior se resume con el número total de tratamientos, el cual se representa de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l} \text{Número total de} \\ \text{tratamientos} \end{array} = (2 \text{ Medios de cultivo}) (2 \text{ Formas de airear}) (3 \text{ Réplicas}) = 12.$$

Por lo tanto, se realizarán 4 cinéticas a las cuales llamaremos tratamientos, estos se realizarán por triplicado. El orden de los tratamientos se describe a continuación.

T1 = Medio mínimo de sales con aireación.

T2 = Medio mínimo de sales sin aireación.

T3 = Medio mínimo a base de *Carica Papaya* con aireación.

T3 = Medio mínimo a base de *Carica Papaya* sin aireación.

Como complemento para evaluar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, se optó por realizar dos cinéticas en el Biorreactor Batch del ITSM, a estos dos últimos experimentos quedarán de la siguiente manera:

T5 = Medio de cultivo de papaya en Biorreactor con aireación.

T6 = Medio de cultivo de papaya en Biorreactor sin aireación

Para este caso solo se tendrán dos tratamientos.

Tabla 3. Diseño experimental:				
Medio de cultivo	Aireación			
	Con aire		Sin aire	
Medio Mínimo de Sales (MMSM)	T1	Repetición 1	T2	Repetición 1
		Repetición 2		Repetición 2
		Repetición 3		Repetición 3
Medio de Cultivo a Base de <i>Carica papaya</i> (MCBCP)	T3	Repetición 1	T4	Repetición 1
		Repetición 2		Repetición 2
		Repetición 3		Repetición 3
Medio Cultivo a Base de <i>C. papaya</i> en Biorreactor (MCBPB)	T5	Repetición 1	T6	Repetición 1

### 3.3 Obtención de la materia prima

*C. papaya* se consiguió en el Mercado Municipal del municipio de Misantla; dicho fruto fue seleccionado con base en un estado de madurez adecuado. El medio mínimo de sales se preparó con los reactivos disponibles en el Laboratorio de Química del ITSM.

### 3.4 Selección del microorganismo

La levadura *S. cerevisiae* utilizada fue suministrada por el Laboratorio de Química del ITSM; dicha levadura se encontraba liofilizada, por lo que se realizó su reactivación.

### 3.5 Reactivación de la cepa

Las concentraciones empleadas para los medios de activación a base de *C. papaya* fueron 30 g/L (Carillo et al, 2010) y 33.33% Peso/Volumen (con base en la concentración utilizada por Ojokoh et al, 2005, que fue de 1/3 de extracto de papaya en 2/3 de agua estéril), respectivamente. Cabe mencionar que a estos medios de cultivo no se les ajustó el pH (no se acidificaron).

El medio mínimo de sales (MMS) se utilizó como medio de control; éste es un medio químicamente definido de uso general para el cultivo de microorganismos poco exigentes (Ramos, 2004). La cantidad de sales y azúcar que se emplearon se describen en la tabla 4; cabe señalar que se sustituyó la glucosa por sacarosa, debido a su alta disponibilidad y que la concentración correspondiente se cambió de 10 a 100 g/L, debido a que se tiene referencia del buen desarrollo de *S. cerevisiae* en estas condiciones.

Tabla 4. Composición del MMS empleado.	
Componente	g/L
Sacarosa	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
pH	6.5-7.0

Los medios de cultivo se esterilizaron en la autoclave, cumpliendo las condiciones estandarizadas (1 bar y 121 °C, durante 15 min); posteriormente se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Para la inoculación de *S. cerevisiae* (reactivación), se adicionaron 15 g del mismo en 400 ml de cada uno de los tres medios de cultivo. Los matraces de activación se colocaron en un agitador a 250 rpm, durante un tiempo aproximado de 12 h, a temperatura ambiente y sin aireación.

### 3.6 Realización de las cinéticas microbianas

Al igual que los medios de cultivo preparados para la reactivación de la levadura, las concentraciones para los medios de cultivo a base de *C. papaya* y medio mínimo de sales fueron 30 g/L, 33.33%Peso/Volumen, y 10 g/L sacarosa, respectivamente.

Se cultivó a *S. cerevisiae* en los medios de cultivo mencionadas, con y sin aireación, por triplicado. Para el suministro de aire se utilizaron bombas de aire para peceras, con flujo de aire de 2.4 L/min. Para el experimento en matraces de 1L, se preparó 800ml de medio de cultivo, en el caso del biorreactor de 3L, se preparó 2.4L de medio de cultivo, previamente se esterilizaron en la autoclave, bajo las siguientes condiciones; a 121°C durante un lapso de tiempo de 15 minutos, a esa temperatura el vapor saturado puede destruir en 10-12 todas las células vegetativas y endosporas presentes en un volumen pequeño de muestra (Prescott, 2004). La cantidad inoculada de *S. cerevisiae* (tomada de los matraces de reactivación) a cada uno de los matraces de los tratamientos fue de 3,500,000 cel/ml.

La población celular se monitoreó cada 4 horas, mediante conteo directo en cámara de Neubauer; al mismo tiempo, los datos recolectados se graficaron. La duración de las cinéticas microbianas fue de aproximadamente de 3 a 5 días.

### **3.7 Determinación y evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae***

Para cada curva de crecimiento de *S. cerevisiae*, se identificó la fase exponencial. Con los datos de dicha fase se determinaron los parámetros cinéticos: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad de división promedio ( $\delta$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ), número de generaciones ( $n$ ), concentración celular máxima ( $Cn_{\max}$ ) y las velocidades de crecimiento celular ( $r_n$ ); esto con el fin de evaluarlos, considerando:

- a) El suministro de aire para cada medio de cultivo,
- b) La condición anaerobia y el medio mínimo de sales como medio de control y
- c) La condición aerobia y el medio mínimo de sales como medio de control.

## CAPÍTULO IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo a base de *Carica papaya* (MCBP), con y sin aireación, se utilizó el medio mínimo de sales (MMS) como medio de cultivo de control; para cada uno de ellos se realizaron las curvas de crecimiento celular por triplicado, para así disponer de valores comparativos en tiempo real. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de acuerdo al medio de cultivo empleado, así como la condición de aireación (aerobia y anaerobia). Para la condición aerobia, el flujo de aire suministrado a los medios de cultivo fue de 2.4 L/min. Es importante mencionar que, dada la gran cantidad de gráficas obtenidas, se decidió mostrar sólo las más representativas para cada experimento (curvas de crecimiento celular y fase exponencial).

### 4.1 Medio mínimo de sales (MMS)

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae*, se decidió utilizar el MMS como medio de cultivo de control, con el fin de contar con parámetros cinéticos de control y compararlos con los parámetros cinéticos de los medios de cultivo a base de *C. papaya*.

#### 4.1.1 Sin aireación

En la figura 6 se muestran los cultivos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales y en condición anaerobia; en todas las cinéticas microbianas realizadas, el contenido de los matraces se mantuvo mezclado gracias a los agitadores de rotación horizontal que los contenían. A su vez, la turbiedad de los medios de cultivo aumentó conforme la población celular incrementaba (al igual que en todos los experimentos realizados).





Figura 6. Cultivo de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación (Fuente: elaboración propia).

En la figura 7, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, obtenidas del experimento triplicado. El comportamiento de dichas curvas es similar, lo cual indica que el crecimiento de éste microorganismo es específico para estas condiciones.

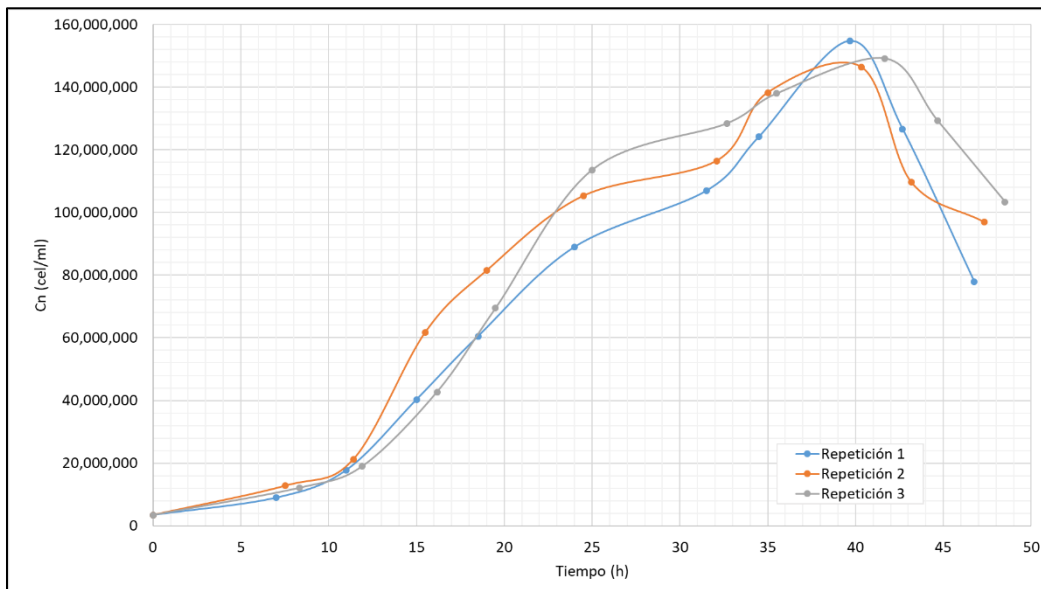


Figura 7. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación (Fuente: elaboración propia).

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 8 se muestran dichas fases correspondientes a cada una de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 7.

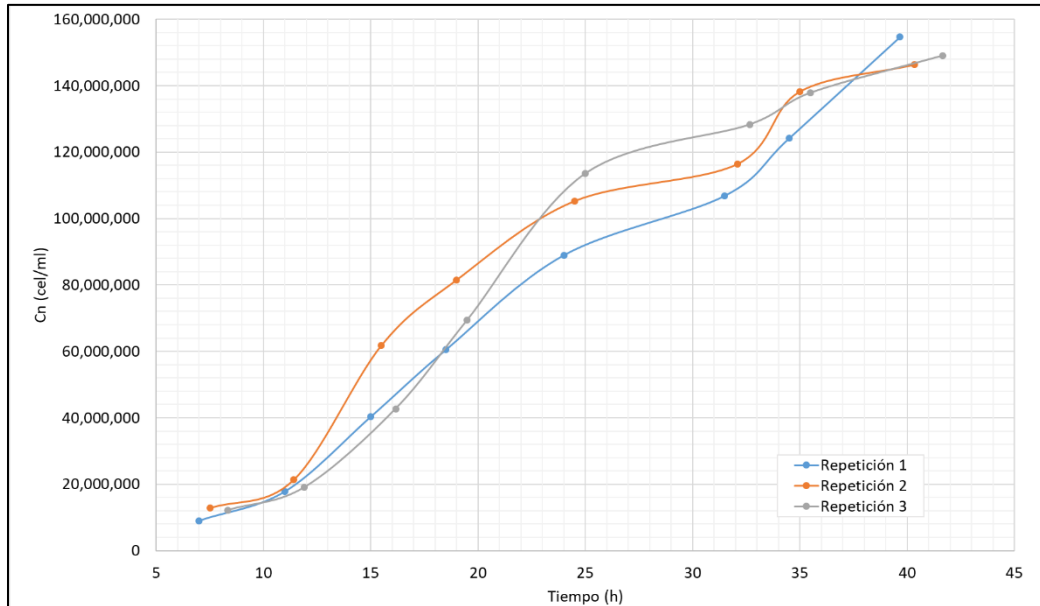


Figura 8. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación (Fuente: elaboración propia).

#### 4.1.1.1 Parámetros cinéticos

A partir de los datos representados en la figura 8, se muestra a continuación la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* para cada uno de los tres tratamientos:

##### 1) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

Para la determinación del valor de  $\mu$ , se emplea la siguiente ecuación lineal:

$$\underbrace{\ln(C_n)}_y = \underbrace{\mu}_{b_1} \cdot \underbrace{t}_x + \underbrace{\ln(C_{n_0})}_{b_0}$$

Sin embargo, sólo puede emplearse cuando los datos tienden a ajustarse al modelo lineal ( $R^2 \geq 0.95$ ). En caso contrario, se realiza un ajuste polinómico a la curva de datos, la cual cumpla con un ajuste adecuado ( $R^2 \geq 0.95$ ), tal como se muestra en la figura 9.

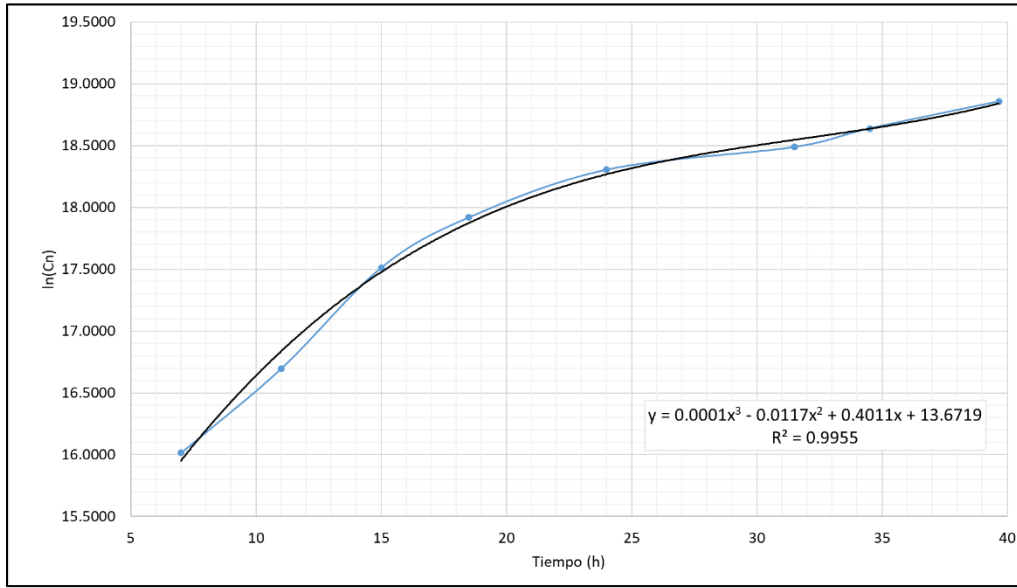


Figura 9. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, tratamiento 1 (Fuente: elaboración propia).

Posteriormente, se deriva dicho ajuste y se obtienen los valores de  $\mu$  a cada tiempo de la fase exponencial. Se promedian los valores más altos de  $\mu$ , dado que éstos son representativos al inicio la fase exponencial, e indican la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) para estas condiciones de crecimiento de *S. cerevisiae*.

**Tratamiento 1:**

En la figura 9 se presenta el ajuste polinómico (de tercer grado) para la curva del logaritmo natural del crecimiento celular respecto al tiempo, del tratamiento 1 (T1):

$$y = 0.0001x^3 - 0.0117x^2 + 0.4011x + 13.6719,$$

la cual puede representarse de manera correcta:

$$\ln(Cn) = 0.0001t^3 - 0.0117t^2 + 0.4011t + 13.6719. \tag{13}$$

Se aprecia que  $\ln(Cn)$  está en función del tiempo:

$$\ln(Cn) = f(t);$$

si se deriva la ecuación anterior respecto al tiempo, se tiene que:

$$\frac{d(\ln(Cn))}{dt} = \mu.$$

Al derivar la ecuación 13 (Respecto al tiempo), se obtiene la siguiente:

$$\mu = \frac{d(\ln(C_n))}{dt} = 0.0003t^2 - 0.0234t + 0.4011, \quad (14)$$

la cual permite obtener los valores de  $\mu$  a los distintos tiempos de la fase exponencial.

En la tabla 4, se presentan los valores de  $\mu$  correspondientes a los tiempos de la fase exponencial (obtenidos al emplear la ecuación 14); de las cuales, se seleccionaron los valores más altos (en negritas) para promediarlos ( $\bar{\mu}$ ).

Tabla 5.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, T1.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
7.0000	9,012,500	<b>0.2520</b>	0.2160
11.0000	17,820,000	<b>0.1800</b>	
15.0000	40,325,000	0.1176	
18.5000	60,500,000	0.0709	
24.0000	89,000,000	0.0123	
31.5000	106,900,000	-0.0383	
34.5000	124,200,000	-0.0491	
39.6667	154,687,500	-0.0551	

De igual manera, se determinaron los valores de  $\bar{\mu}$  para los tratamientos 2 (T2) y 3 (T3), mostrando dichos valores en las tablas 5 y 6, respectivamente.

#### Tratamiento 2:

$$y = 0.0001x^3 - 0.0127x^2 + 0.4305x + 13.6916 \quad R^2 = 0.9795$$

$$\mu = 0.0003t^2 - 0.0254t + 0.4305$$

Tabla 6.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, T2.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
7.5167	12,812,500	<b>0.2565</b>	0.2181
11.4167	21,297,500	<b>0.1796</b>	
15.5000	61,740,000	0.1089	
19.0000	81,500,000	0.0562	
24.5000	105,300,000	-0.0117	
32.0833	116,437,500	-0.0756	
35.0000	138,262,500	-0.0910	
40.3333	146,375,000	-0.1059	

**Tratamiento 3:**

$$y = 0.0001x^3 - 0.0076x^2 + 0.3357x + 13.9099 \quad R^2 = 0.9906$$

$$\mu = 0.0003t^2 - 0.0152t + 0.3357$$

Tabla 7.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, T3.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
8.3333	12,162,500	<b>0.2299</b>	0.2135
11.9167	19,065,000	<b>0.1972</b>	
16.1667	42,735,000	0.1684	
19.5000	69,450,000	0.1534	
25.0000	113,570,000	0.1432	
32.6667	128,362,500	0.1593	
35.5000	137,925,000	0.1742	
41.6667	149,125,000	0.2232	

En los siguientes cálculos, se utilizan los subíndices 1, 2 y 3 en los parámetros cinéticos para hacer referencia a los tratamientos correspondientes.

**2) Velocidad de división promedio ( $\delta$ ):**

$$\mu = 0.301 \cdot \delta$$

$$\delta = \frac{\mu}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$\delta_1 = \frac{\mu_1}{0.301} = \frac{0.2160 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.7176 \text{ h}$$

$$\delta_2 = \frac{\mu_2}{0.301} = \frac{0.2181 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.7246 \text{ h}$$

$$\delta_3 = \frac{\mu_3}{0.301} = \frac{0.2135 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.7093 \text{ h}$$

**3) Tiempo de duplicación ( $t_d$ ):**

$$t_d = \frac{1}{\delta}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$t_{d,1} = \frac{1}{\delta_1} = \frac{1}{0.7176 \text{ h}^{-1}} = 1.3935 \text{ h}$$

$$t_{d,2} = \frac{1}{\delta_2} = \frac{1}{0.7246 \text{ h}^{-1}} = 1.3801 \text{ h}$$

$$t_{d,3} = \frac{1}{\delta_3} = \frac{1}{0.7093 \text{ h}^{-1}} = 1.4098 \text{ h}$$

#### 4) Números de generaciones ( $n$ ):

$$n = \frac{\log_{10}(Cn) - \log_{10}(Cn_0)}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$n_1 = \frac{\log_{10}(154,687,500) - \log_{10}(9,012,500)}{0.301} = 4.1017$$

$$n_2 = \frac{\log_{10}(146,375,000) - \log_{10}(12,812,500)}{0.301} = 3.5192$$

$$n_3 = \frac{\log_{10}(149,125,000) - \log_{10}(12,162,500)}{0.301} = 3.6164$$

#### 5) Concentración celular máxima ( $Cn_{max}$ ):

La máxima concentración celular obtenida corresponde al ultima valor de concentración celular de la fase exponencial, para cada tratamiento fue:

$$Cn_{max,1} = 154,687,500 \text{ cel/ml}$$

$$Cn_{max,2} = 146,375,000 \text{ cel/ml}$$

$$Cn_{max,3} = 149,125,000 \text{ cel/ml}$$

#### 6) Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ):

Los valores de  $r_n$  se obtienen mediante la ecuación:  $r_n = \mu \cdot Cn$ . Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para cada uno de los tratamientos (ver tablas 8, 9 y 10).

Tabla 8. Valores de  $r_n$ , para *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, T1.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
7.0000	9,012,500	0.2160	1,946,700
11.0000	17,820,000		3,849,120
15.0000	40,325,000		8,710,200
18.5000	60,500,000		13,068,000
24.0000	89,000,000		19,224,000
31.5000	106,900,000		23,090,400
34.5000	124,200,000		26,827,200
39.6667	154,687,500		33,412,500

Tabla 9. Valores de  $r_n$ , para *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, T2.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
7.5167	12,812,500	0.2181	2,794,406.25
11.4167	21,297,500		4,644,984.75
15.5000	61,740,000		13,465,494.00
19.0000	81,500,000		17,775,150.00
24.5000	105,300,000		22,965,930.00
32.0833	116,437,500		25,395,018.75
35.0000	138,262,500		30,155,051.25
40.3333	146,375,000		31,924,387.50

Tabla 10. Valores de  $r_n$ , para *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, T3.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
8.3333	12,162,500	0.2135	2,596,693.75
11.9167	19,065,000		4,070,377.50
16.1667	42,735,000		9,123,922.50
19.5000	69,450,000		14,827,575.00
25.0000	113,570,000		24,247,195.00
32.6667	128,362,500		27,405,393.75
35.5000	137,925,000		29,446,987.50
41.6667	149,125,000		31,838,187.50

#### 4.1.2 Con aireación

En la figura 10 se muestran los cultivos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales y en condición aerobia; para el suministro de aire se utilizaron bombas de aire para pecera con flujo volumétrico de 2.4 L/min. En los extremos de cada manguera transparente (conectados con las mangueras de hule de los matraces) se colocó un trozo de algodón (filtro de aire) sujetado con una aguja atravesada, para evitar que dicho filtro fuera arrastrado por el flujo de aire; esto con el fin de evitar el paso de microorganismos externos y con ello, la contaminación de los medios de cultivo.



Figura 10. Cultivo de *S. cerevisiae* en MMS con aireación (Fuente: elaboración propia).

En la figura 11, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMS con aireación, obtenidas del experimento triplicado. Se observa un comportamiento similar entre dichas curvas, lo cual indica que el crecimiento de este microorganismo es específico para estas condiciones.



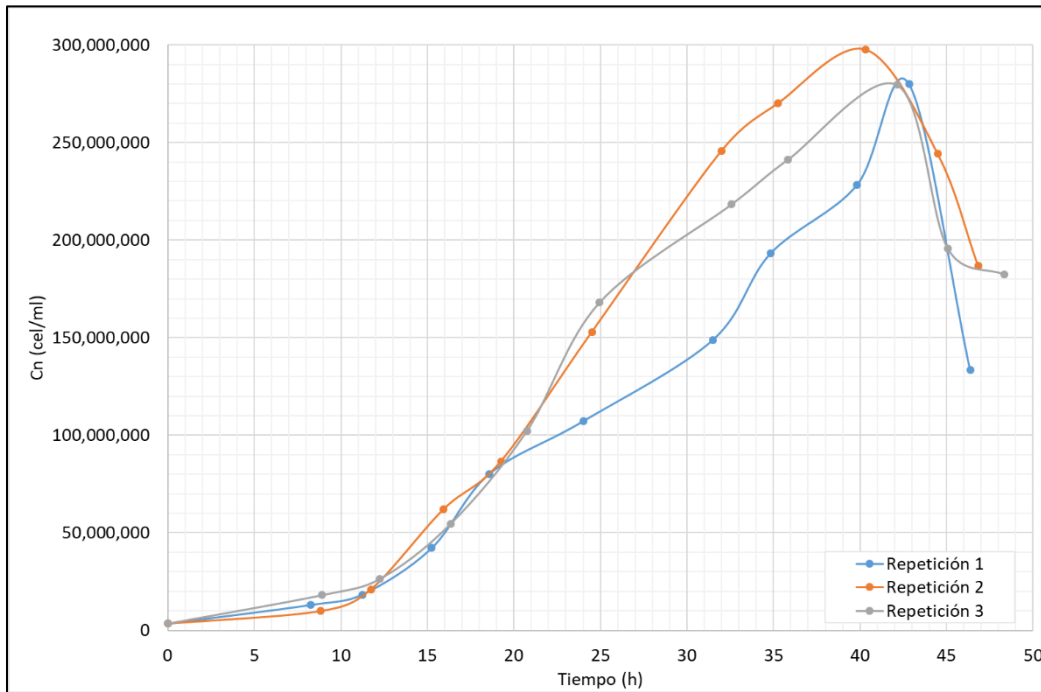


Figura 11. Curva de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MMS con aireación (Fuente: elaboración propia).

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 12 se muestran dichas fases correspondientes a cada una de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 11.

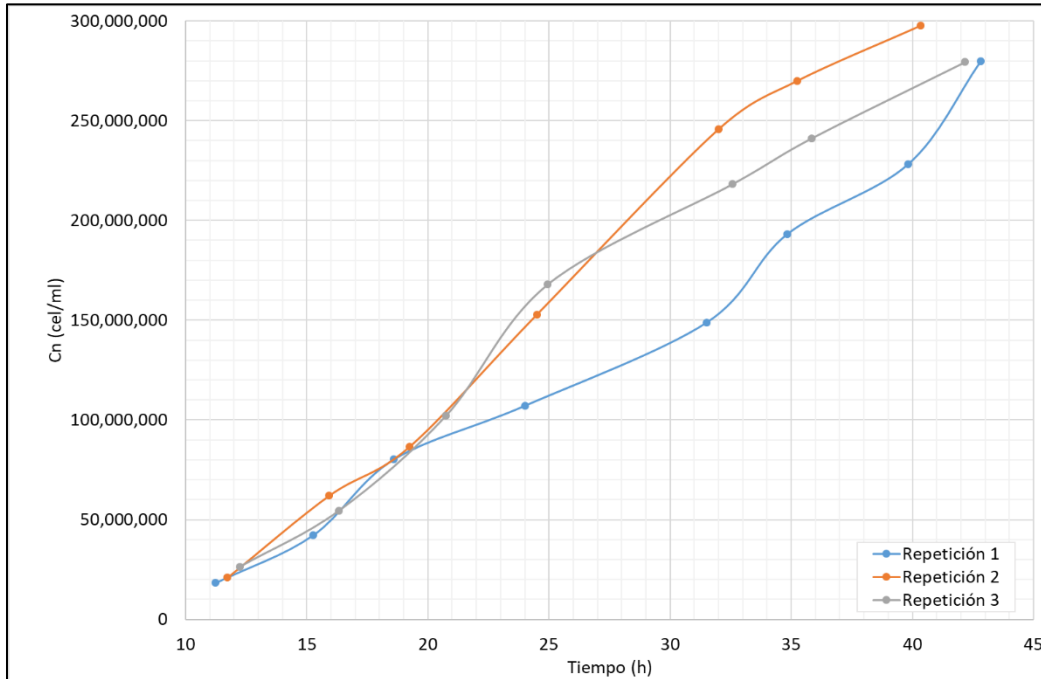


Figura 12. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMS con aireación (Fuente: elaboración propia).

#### 4.1.2.1 Parámetros cinéticos

Con base en la metodología utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, se obtuvieron los siguientes resultados para los datos representados en la figura 12:

##### 1) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

A continuación, para cada tratamiento se presentan los ajustes polinómicos de las curvas del logaritmo natural de la concentración celular respecto al tiempo (con  $R^2 \geq 0.95$ ), así como su derivada (respecto al tiempo) y el valor de  $\overline{\mu}$  (ver tablas 10, 11 y 12).

**Tratamiento 1:**

$$y = 0.0002x^3 - 0.0168x^2 + 0.5633x + 12.2771 \quad R^2 = 0.9943$$

$$\mu = 0.0006t^2 - 0.0336t + 0.5633$$

Tabla 11.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MMS con aireación, T1.

$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
11.2333	18,375,000	<b>0.2616</b>	0.2260
15.2500	42,200,000	<b>0.1904</b>	
18.5833	80,250,000	0.1461	
24.0000	107,200,000	0.1025	
31.5000	148,875,000	0.1003	
34.8333	193,200,000	0.1209	
39.8333	228,300,000	0.1769	
42.8333	280,000,000	0.2249	

**Tratamiento 2:**

$$y = 0.0001x^3 - 0.0134x^2 + 0.5149x + 12.5095 \quad R^2 = 0.9952$$

$$\mu = 0.0003t^2 - 0.0268t + 0.5149$$

Tabla 12.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MMS con aireación, T2.

$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
11.7333	21,030,000	<b>0.2417</b>	0.2030
15.9167	61,987,500	<b>0.1643</b>	
19.2500	86,687,500	0.1102	
24.5000	152,900,000	0.0384	
32.0000	245,750,000	-0.0355	
35.2500	270,000,000	-0.0570	
40.3333	297,600,000	-0.0780	

**Tratamiento 3:**

$$y = -0.003x^2 + 0.2379x + 14.761 \quad R^2 = 0.9921$$

$$\mu = -0.006t + 0.2379$$

Tabla 13.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MMS con aireación, T3.

$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
8.9167	18,137,500	<b>0.1844</b>	0.1744
12.2500	26,370,000	<b>0.1644</b>	
16.3333	54,487,500	0.1399	
20.7500	102,125,000	0.1134	
24.9500	168,000,000	0.0882	
32.5833	218,350,000	0.0424	
35.8333	241,200,000	0.0229	
42.1667	279,500,000	-0.0151	

**2) Velocidad de división promedio ( $\delta$ ):**

$$\mu = 0.301 \cdot \delta$$

$$\delta = \frac{\mu}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$\delta_1 = \frac{\mu_1}{0.301} = \frac{0.2260 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.7508 \text{ h}$$

$$\delta_2 = \frac{\mu_2}{0.301} = \frac{0.2030 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.6744 \text{ h}$$

$$\delta_3 = \frac{\mu_3}{0.301} = \frac{0.1744 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.5794 \text{ h}$$

**3) Tiempo de duplicación ( $t_d$ ):**

$$t_d = \frac{1}{\delta}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$t_{d,1} = \frac{1}{\delta_1} = \frac{1}{0.7508 \text{ h}^{-1}} = 1.3319 \text{ h}$$

$$t_{d,2} = \frac{1}{\delta_2} = \frac{1}{0.6744 \text{ h}^{-1}} = 1.4828 \text{ h}$$

$$t_{d,3} = \frac{1}{\delta_3} = \frac{1}{0.5794 \text{ h}^{-1}} = 1.7259 \text{ h}$$

#### 4) Números de generaciones ( $n$ ):

$$n = \frac{\log_{10}(Cn) - \log_{10}(Cn_0)}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$n_1 = \frac{\log_{10}(280,000,000) - \log_{10}(18,375,000)}{0.301} = 3.9300$$

$$n_2 = \frac{\log_{10}(297,600,000) - \log_{10}(21,030,000)}{0.301} = 3.8232$$

$$n_3 = \frac{\log_{10}(279,500,000) - \log_{10}(18,137,500)}{0.301} = 3.9462$$

#### 5) Concentración celular máxima ( $Cn_{max}$ ):

La máxima concentración celular obtenida corresponde al ultima valor de concentración celular de la fase exponencial, para cada tratamiento fue:

$$Cn_{max,1} = 280,000,000 \text{ cel/ml}$$

$$Cn_{max,2} = 297,600,000 \text{ cel/ml}$$

$$Cn_{max,3} = 279,500,000 \text{ cel/ml}$$

#### 6) Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ):

Los valores de  $r_n$  se obtienen mediante la ecuación:  $r_n = \mu \cdot Cn$ . Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para cada uno de los tratamientos (ver tablas 13, 14 y 15).

Tabla 14. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MMS con aireación, T1.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
11.2333	18,375,000	0.2260	4,152,750
15.2500	42,200,000		9,537,200

18.5833	80,250,000		18,136,500
24.0000	107,200,000		24,227,200
31.5000	148,875,000		33,645,750
34.8333	193,200,000		43,663,200
39.8333	228,300,000		51,595,800
42.8333	280,000,000		63,280,000

Tabla 15. Valores de  $r_n$ , para *S. cerevisiae* en MMS con aireación, T2.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
11.7333	21,030,000	0.2030	4,269,090
15.9167	61,987,500		12,583,463
19.2500	86,687,500		17,597,563
24.5000	152,900,000		31,038,700
32.0000	245,750,000		49,887,250
35.2500	270,000,000		54,810,000
40.3333	297,600,000		60,412,800

Tabla 16. Valores de  $r_n$ , para *S. cerevisiae* en MMS con aireación, T3.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
8.9167	18,137,500	0.1744	3,163,180
12.2500	26,370,000		4,598,928
16.3333	54,487,500		9,502,620
20.7500	102,125,000		17,810,600
24.9500	168,000,000		29,299,200
32.5833	218,350,000		38,080,240
35.8333	241,200,000		42,065,280
42.1667	279,500,000		48,744,800

### 4.1.3 Resumen de los parámetros cinéticos

En la tabla 16, se muestran de forma resumida los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales (MMS), con y sin aireación.

Tabla 17. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MMS.										
T	Sin aireación					Con aireación				
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\delta$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ ( $h$ )	$n$	$Cn_{max}$ ( $cel/ml$ )	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\delta$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ ( $h$ )	$n$	$Cn_{max}$ ( $cel/ml$ )
1	0.2160	0.7176	1.3935	4.1017	154,687,500	0.2260	0.7508	1.3319	3.9300	280,000,000
2	0.2181	0.7246	1.3801	3.5192	146,375,000	0.2030	0.6744	1.4828	3.8232	297,600,000
3	0.2135	0.7093	1.4098	3.6164	149,125,000	0.1744	0.5794	1.7259	3.9462	279,500,000
P	0.2159	0.7172	1.3945	3.7458	150,062,500	0.2011	0.6682	1.5135	3.8998	285,700,000

T=Tratamiento, P=Promedio,  $\mu$  =Velocidad específica de crecimiento,  $\delta$  =Velocidad de división promedio,  $t_d$  =Tiempo de duplicación,  $n$  =Número de generaciones,  $Cn_{max}$  =Concentración celular máxima.

### 4.2 Medio de cultivo a base de *Carica papaya* (MCBP)

Para la elaboración del MCBP se tomó como referencia la concentración utilizada por Ojokoh et al, 2005, que fue de 1/3 de extracto de papaya (jugo) en 2/3 de agua estéril. Debido a que el extracto de papaya obtenido fue mínimo, se decidió preparar el medio de cultivo con 1/3 de fruta fresca (en gramos) en 2/3 de agua (en mililitros), empleando la licuadora industrial ubicada en el Laboratorio de Alimentos del ITSM, para lograr una mayor extracción de nutrientes de dicho fruto en el agua; es decir, por cada 33.33 g *C. papaya* se adicionaron 66.66ml de agua, lo cual da como resultado una concentración de 50%Peso/Volumen y se representa de la siguiente manera:

$$33.33\% \text{Peso/Volumen} = \frac{33.33g \text{ } C. \text{ papaya}}{100 \text{ ml Agua}} \times 100.$$

La concentración empleada también se puede representar como el resultado de la relación gramos de papaya - mililitros de agua, como se muestra a continuación ( $C_p$ ):

$$C_p = \frac{33.33g \text{ } C. \text{ papaya}}{100 \text{ ml Agua}} = 0.3333 \frac{g \text{ } C. \text{ papaya}}{\text{ml Agua}} = 333.3 \frac{g \text{ } C. \text{ papaya}}{\text{L Agua}}$$

La solución fue filtrada con tela de pañalina, obteniéndose así, un medio de cultivo libre de macropartículas (ver figura 19a) que dificultarían el conteo celular en la cámara de

Neubauer; en la figura 19b se muestra uno de los matraces con MCBP antes de esterilizar, para la condición anaerobia se colocaron tapones de algodón, mientras que para la condición anaerobia se colocaron tapones de algodón con manguera de hule (al igual que en los experimentos anteriores).

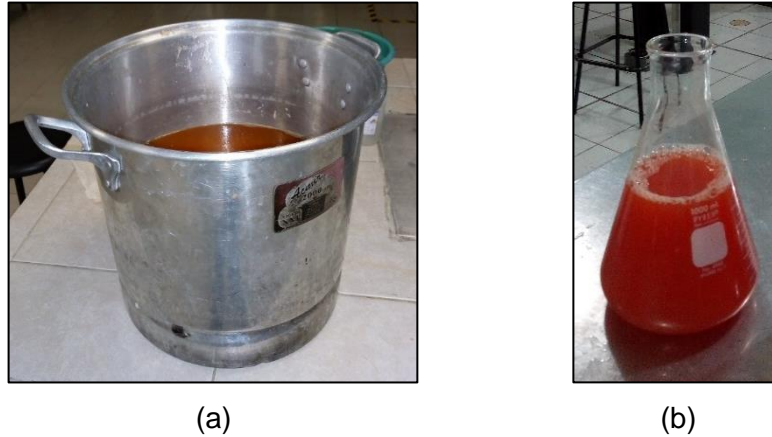


Figura 13. Medio de cultivo a base de *C. papaya* (Fuente: elaboración propia).

#### 4.2.1 Sin aireación

En la figura 14, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBP sin aireación, obtenidas del experimento triplicado; las curvas de crecimiento celular de los tratamientos 1, 2 y 3 son similares, lo cual indica que el crecimiento de este microorganismo es específico para estas condiciones.

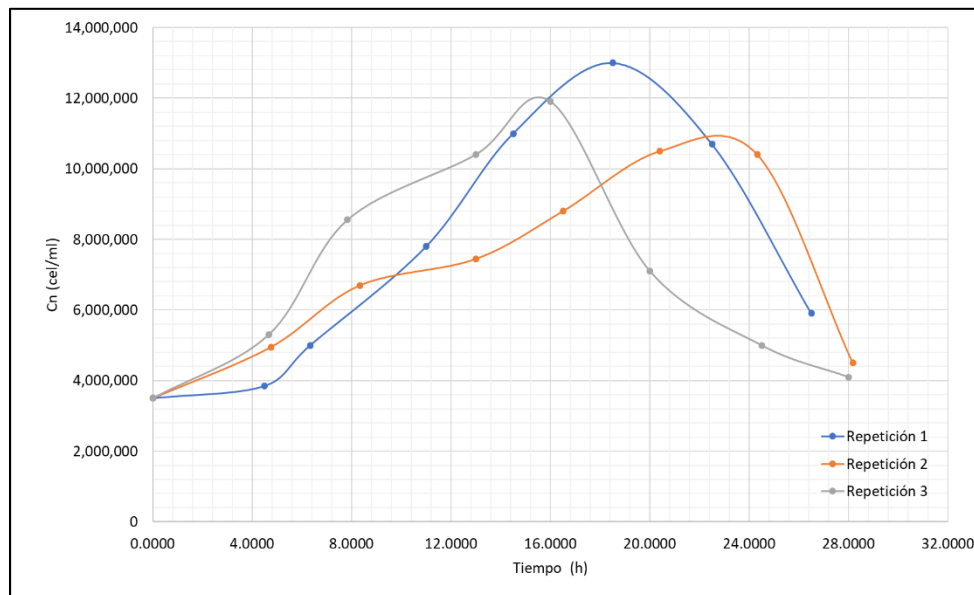




Figura 14. Curva de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MCBP sin aireación (Fuente: elaboración propia).

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 15 se muestran dichas fases correspondientes a las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* de los tratamientos 1, 2 y 3.

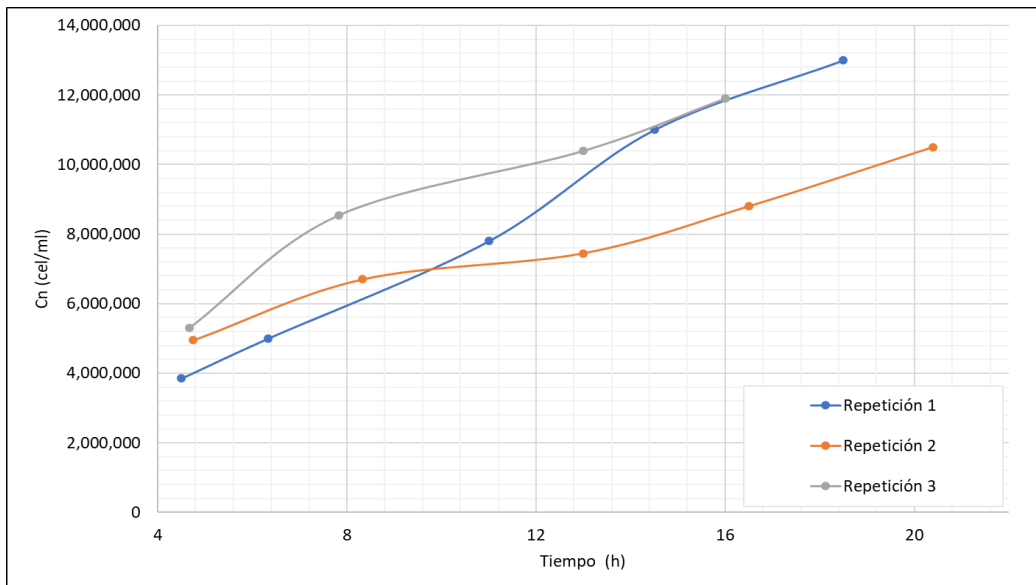


Figura 15. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBP sin aireación (Fuente: elaboración propia).

#### 4.2.1.1 Parámetros cinéticos

Con base en la metodología utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MMS sin aireación, se obtuvieron los siguientes resultados para los datos representados en la figura 15:

##### 1) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

A continuación, para los tratamientos 1 y 2 se presentan los ajustes lineales de las curvas del logaritmo natural de la concentración celular respecto al tiempo (con). Para el caso del tratamiento 3 se le determino un ajuste polinómico de grado 2, dado que su  $r^2$  para el ajuste lineal fue menor a 0.95

##### Tratamiento 1:

$$y = 0.0383x + 6.4463 \quad R^2 = 0.9747$$

Dado que los datos se ajustan a un modelo lineal con una con un porcentaje de varianza de 97.47%; se aplica directamente la siguiente ecuación para calcular la velocidad específica de crecimiento.

$$\underbrace{\ln(Cn)}_y = \underbrace{\mu}_{b_1} \cdot \underbrace{t}_x + \underbrace{\ln(Cn_0)}_{b_0} \quad (15)$$

Por lo tanto  $\mu = 0.0383h^{-1}$

**Tratamiento 2:**

$$y = 0.0194x + 6.6267 \quad R^2 = 0.9663$$

Por lo tanto  $\mu = 0.0194h^{-1}$

**Tratamiento 3:**

En este caso el ajuste lineal presento una r cuadrada menor a 0.95, por lo tanto, ya no aplica la ecuación 15, para ello se implementa un ajuste polinómico a la curva de datos, la cual cumple con un ajuste polinómico ( $R^2 \geq 0.95$ ) tal como se observa en la figura16.

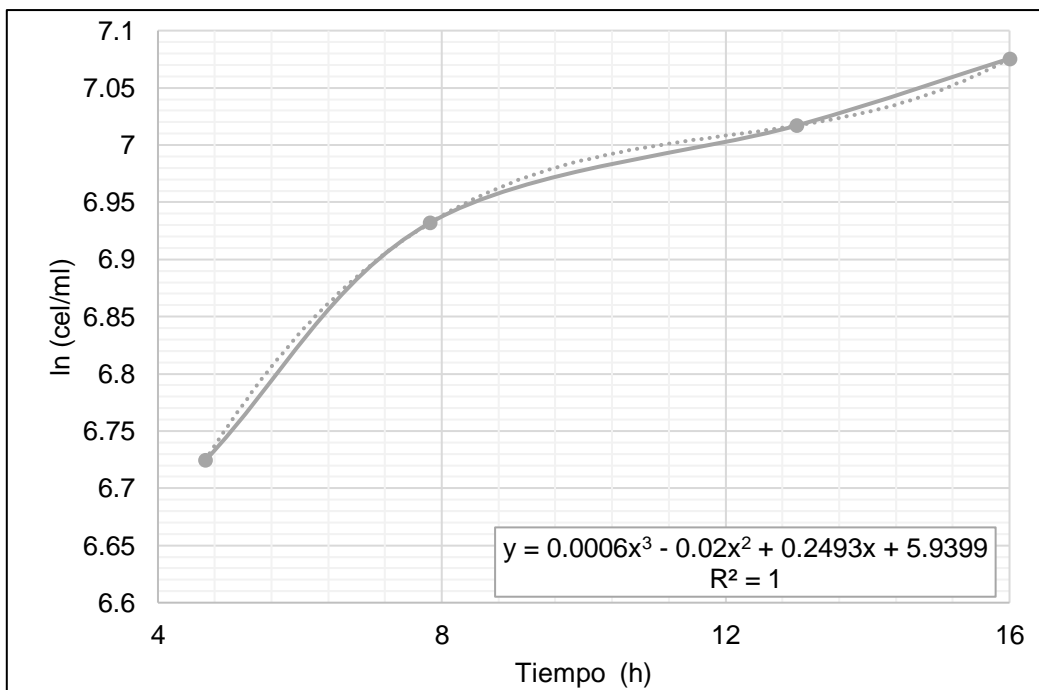


Figura 16. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBP sin aireación tratamiento 3

(Fuente: elaboración propia).

Seguidamente se deriva la ecuación polinómica de grado tres y se obtiene los valores de  $\mu$  a cada tiempo de la fase exponencial, se promedian los valores de  $\mu$  considerando los primeros dos datos, dado en que ello se tiene los valores más altos, e indican la máxima velocidad específica de crecimiento.

Ecuación polinómica que se ajusta a la fase exponencial de la figura 16.

$$y = 0.0006x^3 - 0.02x^2 + 0.2493x + 5.9399$$

Otra forma de representación.

$$\ln(Cn) = 0.0006t^3 - 0.02t^2 + 0.2493t + 5.9399. \quad (15)$$

Como  $\ln(Cn)$  está en función al tiempo al derivar se obtiene lo siguiente.

$$\frac{d(\ln(Cn))}{dt} = \mu$$

Derivando la ecuación 15 con respecto al tiempo.

$$\mu = \frac{d(\ln(Cn))}{dt} = 0.0018t^2 - 0.04t + 0.2493. \quad (16)$$

Tabla.17 $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T3.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
4.6667	5,300,000	<b>0.1018</b>	0.0741
7.8333	8,550,000	<b>0.0464</b>	
13.0000	10,400,000	0.0335	
16.0000	11,900,000	0.0701	

## 2) Velocidad de división promedio ( $\delta$ ):

$$\mu = 0.301 \cdot \delta$$

$$\delta = \frac{\mu}{0.301}$$

Para los 2 tratamientos se tiene que:

$$\delta_1 = \frac{0.0383 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.1272 \text{ h}^{-1}$$

$$\delta_2 = \frac{0.0194 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.0644 \text{ h}^{-1}$$

$$\delta_3 = \frac{0.0741 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.2461 \text{ h}^{-1}$$

### 3) Tiempo de duplicación ( $t_d$ ):

$$t_d = \frac{1}{\delta}$$

Para los 2 tratamientos se tiene que:

$$t_{d,1} = \frac{1}{0.1272 \text{ h}^{-1}} = 7.8616 \text{ h}$$

$$t_{d,2} = \frac{1}{0.0644 \text{ h}^{-1}} = 15.5279 \text{ h}$$

$$t_{d,3} = \frac{1}{0.2461 \text{ h}^{-1}} = 4.0633 \text{ h}$$

### 4) Números de generaciones ( $n$ ):

$$n = \frac{\log_{10}(C_n) - \log_{10}(C_{n_0})}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$n_1 = \frac{\log_{10}(13,000,000) - \log_{10}(3,850,000)}{0.301} = 1.7557$$

$$n_2 = \frac{\log_{10}(10,500,000) - \log_{10}(4,950,000)}{0.301} = 1.0849$$

$$n_3 = \frac{\log_{10}(11,900,000) - \log_{10}(5,300,000)}{0.301} = 1.1670$$

### 5) Concentración celular máxima ( $C_{n_{max}}$ ):

La máxima concentración celular obtenida corresponde al último valor de concentración celular de la fase exponencial, para cada tratamiento fue:

$$C_{n_{max,1}} = 13,000,000 \text{ cel/ml}$$

$$C_{n_{max,2}} = 10,500,000 \text{ cel/ml}$$

$$C_{n_{max,3}} = 11,900,000 \text{ cel/ml}$$

### 6) Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ):

Los valores de  $r_n$  se obtienen mediante la ecuación:  $r_n = \mu \cdot Cn$ . Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para los tratamientos 1, 2 y 3 (ver tablas 18, 19 y 20).

Tabla 18. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T1.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
4.5000	3,850,000	0.0383	147,455
6.3333	5,000,000		191,500
11.0000	7,800,000		298,740
14.5000	11,000,000		421,300
18.5000	13,000,000		497,900
Tabla 19. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T2.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
4.7500	4,950,000	0.0194	96,030
8.3333	6,700,000		129,980
13.0000	7,450,000		144,530
16.5000	8,800,000		170,720
20.4000	10,500,000		203,700

Tabla 20. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP sin aireación, T3.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
4.6667	5,300,000	0.0741	392,730
7.8333	8,550,000		633,555
13.0000	10,400,000		770,640
16.0000	11,900,000		881,790

#### 4.2.2 Con aireación

En la figura 17, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBP con aireación, obtenidas del experimento triplicado. Se observa un comportamiento similar entre dichos tratamientos 1, 2 y 3. Para ello, se aprecia que el crecimiento de este microorganismo es específico para estas condiciones.

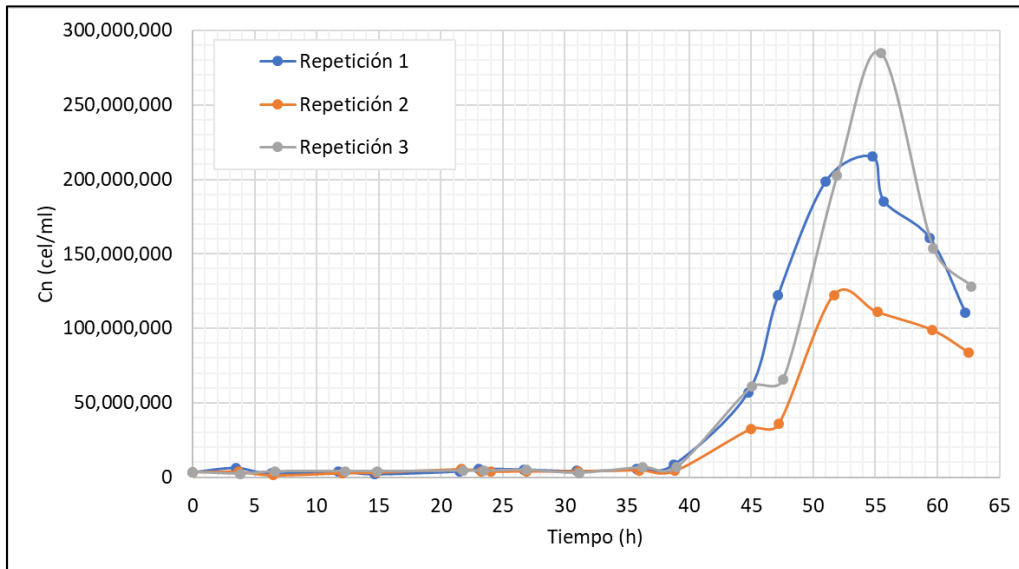


Figura 17. Curva de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MCBP con aireación (Fuente: elaboración propia).

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 18 se muestran dichas fases correspondientes a cada una de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 17.

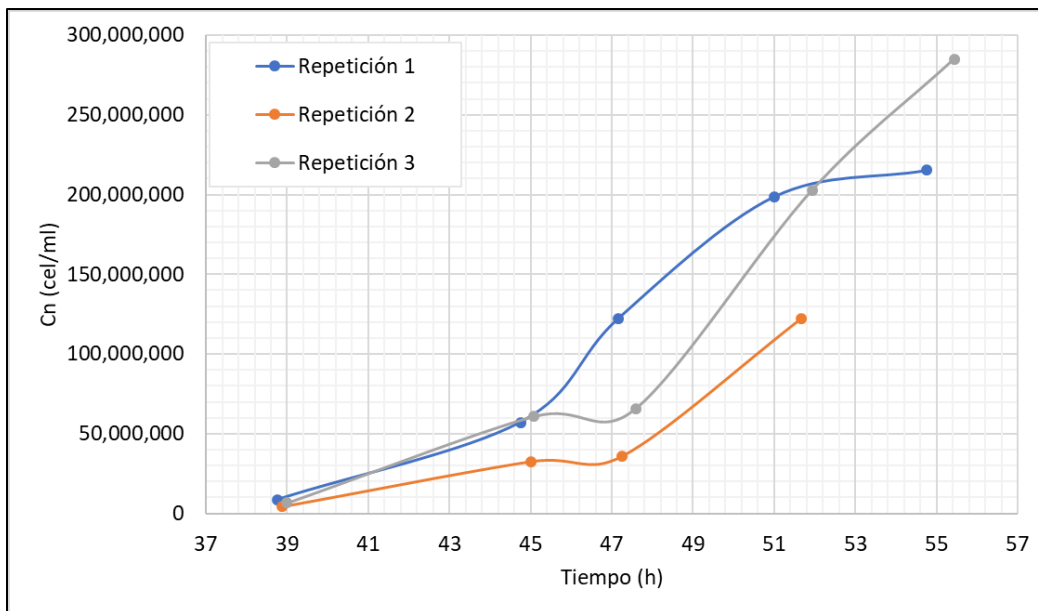


Figura 18. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBP con aireación (Fuente: elaboración propia).

#### 4.2.2.1 Parámetros cinéticos

Con base en la metodología utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MCBP sin aireación, se obtuvieron los siguientes resultados para los datos representados en la figura 18:

##### 1) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

A continuación, para cada tratamiento se presentan los ajustes polinómicos de las curvas del logaritmo natural de la concentración celular respecto al tiempo (con  $R^2 \geq 0.95$ ), así como su derivada (respecto al tiempo) y el valor de  $\bar{\mu}$  (ver tablas 21, 22 y 23).

##### Tratamiento 1:

$$y = -0.0136x^2 + 1.4807x - 20.953 \quad R^2 = 0.9963$$

$$\mu = -0.0272x + 1.4807$$

Tabla 21. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T1.			
$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
38.7500	8,550,000	<b>0.4267</b>	0.3451
44.7500	57,150,000	<b>0.2635</b>	
47.1667	122,400,000	0.1978	
51.0000	198,600,000	0.0935	
54.7500	215,200,000	-0.0085	

##### Tratamiento 2:

$$y = -0.0054x^2 + 0.7413x - 5.4222 \quad R^2 = 0.9815$$

$$\mu = -0.0108x + 0.7413$$

Tabla 22. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T2.			
$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
38.8667	4,250,000	<b>0.3215</b>	0.2884
45.0000	32,550,000	<b>0.2553</b>	
47.2500	36,000,000	0.2310	
51.6667	122,400,000	0.1833	

**Tratamiento 3:**

$$y = -0.0088x^2 + 1.0545x - 12.047 \quad R^2 = 0.9833$$

$$\mu = -0.0176x + 1.0545$$

Tabla 23.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MCBP con aireación, T3.

$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
39.0000	6,600,000	<b>0.3681</b>	0.3146
45.0833	60,900,000	<b>0.2610</b>	
47.5833	65,750,000	0.2170	
51.9333	202,800,000	0.1405	
55.4333	285,000,000	0.0789	

**2) Velocidad de división promedio ( $\delta$ ):**

$$\mu = 0.301 \cdot \delta$$

$$\delta = \frac{\mu}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$\delta_1 = \frac{0.3451 h^{-1}}{0.301} = 1.1465 h^{-1}$$

$$\delta_2 = \frac{0.2884 h^{-1}}{0.301} = 0.9581 h^{-1}$$

$$\delta_3 = \frac{0.3146 h^{-1}}{0.301} = 1.0452 h^{-1}$$

**3) Tiempo de duplicación ( $t_d$ ):**

$$t_d = \frac{1}{\delta}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$t_{d,1} = \frac{1}{1.1465 h^{-1}} = 0.8722 h$$

$$t_{d,2} = \frac{1}{0.9581 h^{-1}} = 1.0437 h$$

$$t_{d,3} = \frac{1}{1.0452 h^{-1}} = 1.0452 h$$

**4) Números de generaciones ( $n$ ):**



$$n = \frac{\log_{10}(C_n) - \log_{10}(C_{n_0})}{0.301}$$

Para los 3 tratamientos se tiene que:

$$n_1 = \frac{\log_{10}(215,200,000) - \log_{10}(8,550,000)}{0.301} = 4.6541$$

$$n_2 = \frac{\log_{10}(122,400,000) - \log_{10}(4,250,000)}{0.301} = 4.8485$$

$$n_3 = \frac{\log_{10}(285,000,000) - \log_{10}(6,600,000)}{0.301} = 5.4329$$

### 5) Concentración celular máxima ( $C_{n_{max}}$ ):

La máxima concentración celular obtenida corresponde al último valor de concentración celular de la fase exponencial, para cada tratamiento fue:

$$C_{n_{max,1}} = 215,200,000 \text{ cel/ml}$$

$$C_{n_{max,2}} = 122,400,000 \text{ cel/ml}$$

$$C_{n_{max,3}} = 285,000,000 \text{ cel/ml}$$

### 6) Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ):

Los valores de  $r_n$  se obtienen mediante la ecuación:  $r_n = \mu \cdot C_n$ . Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para cada uno de los tratamientos (ver tablas 37, 38 y 39).

Tabla 24. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T1.			
$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
38.7500	8,550,000	0.3451	2,950,605
44.7500	57,150,000		19,722,465
47.1667	122,400,000		42,240,240
51.0000	198,600,000		68,536,860
54.7500	215,200,000		74,265,520

Tabla 25. Valores de $r_n$ , para <i>S. cerevisiae</i> en MCBP con aireación, T2.			
$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
38.8667	4,250,000	0.2884	1,225,700
45.0000	32,550,000		9,387,420
47.2500	36,000,000		10,382,400
51.6667	122,400,000		35,300,160

Tabla 26. Valores de  $r_n$ , para *S. cerevisiae* en MCBP con aireación, T3.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
39.0000	6,600,000	0.3146	2,076,360
45.0833	60,900,000		19,159,140
47.5833	65,750,000		20,684,950
51.9333	202,800,000		63,800,880
55.4333	285,000,000		89,661,000

#### 4.2.3 Resumen de los parámetros cinéticos

En la tabla 27, se muestran de forma resumida los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio de cultivo a base de *C. papaya* (MCBP), con y sin aireación.

Tabla 27. Resumen de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MCBP.

T	Sin aireación					Con aireación				
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\delta$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)	$n$	$C_{n_{max}}$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\delta$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)	$n$	$C_{n_{max}}$ (cel/ml)
1	0.0383	0.1272	7.8616	1.7557	8,130,000	0.3451	1.1465	0.8722	4.6541	215,200,000
2	0.0194	0.0644	15.5279	1.0849	7,680,000	0.2884	0.9581	1.0437	4.8485	122,400,000
3	0.0741	0.2461	4.0633	1.1670	9,037,500	0.3146	1.9452	1.0452	5.4329	285,000,000
P	0.1318	0.1459	9.1509	1.3358	8,282,500	0.3160	1.3499	0.9870	4.9785	207,533,333

T=Tratamiento, P=Promedio,  $\mu$  =Velocidad específica de crecimiento,  $\delta$  =Velocidad de división promedio,  
 $t_d$  =Tiempo de duplicación,  $n$  =Número de generaciones,  $C_{n_{max}}$  =Concentración celular máxima.

### 4.3 Medio de cultivo a base de *C. papaya* en el Biorreactor (MCBPB)

#### 4.3.1 Biorreactor sin aireación

En la figura 19, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMS en biorreactor sin aireación. Se observa en la curva de crecimiento las fases de latencia, exponencial, y de muerte.

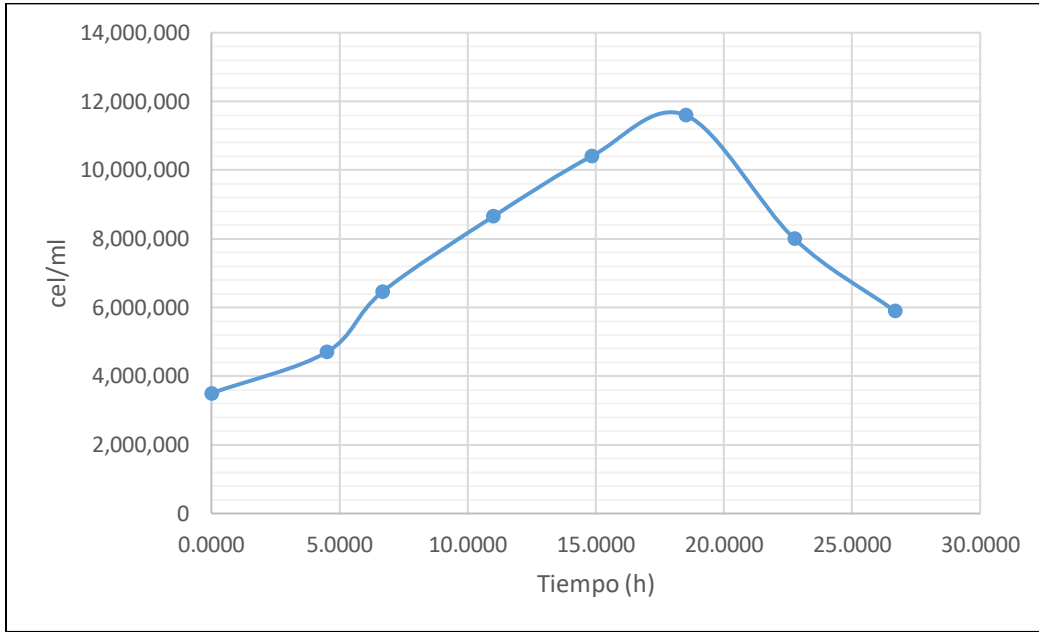


Figura 19. Curva de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MCBPB sin aireación (Fuente: elaboración propia).

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 2), en la figura 20 se muestra dicha fase correspondiente a la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 19.

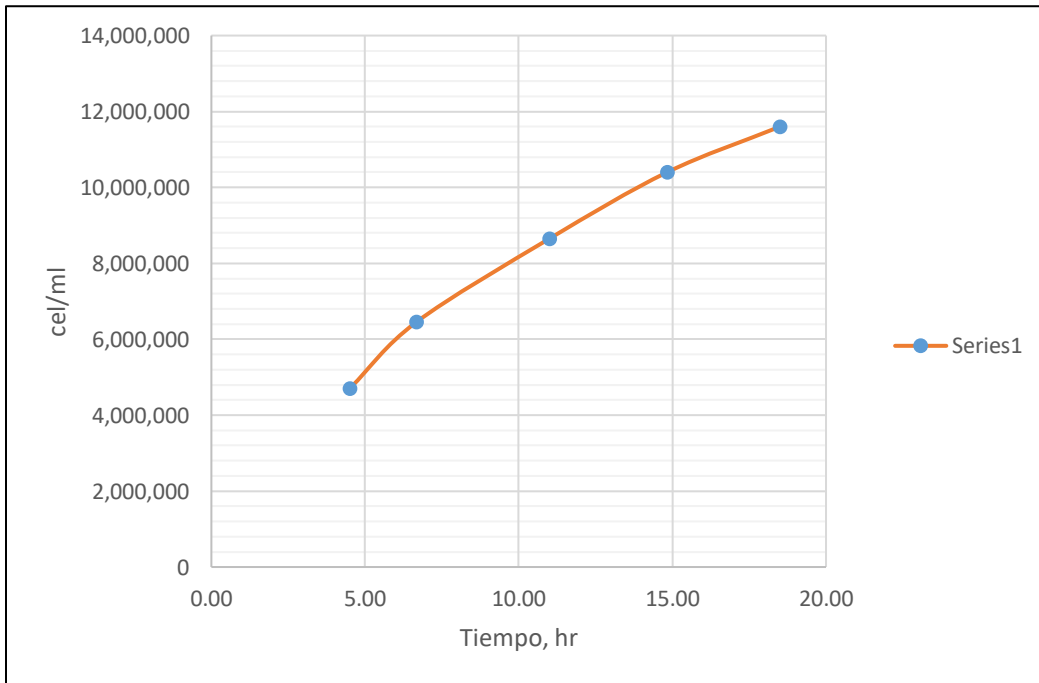


Figura 20. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBPB sin aireación (Fuente: elaboración propia).

#### 4.3.1.1 Parámetros cinéticos en el Biorreactor

A partir de los datos representados en la figura 20, se muestra a continuación la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en tal condición metabólica:

##### 1) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

Para la determinación del valor de  $\mu$ , se emplea la ecuación 13.

A continuación, en la figura 21 se muestra la gráfica de  $\ln(C_n)$  contra tiempo, empleando los datos de la figura 20, así como su ajuste polinómico.

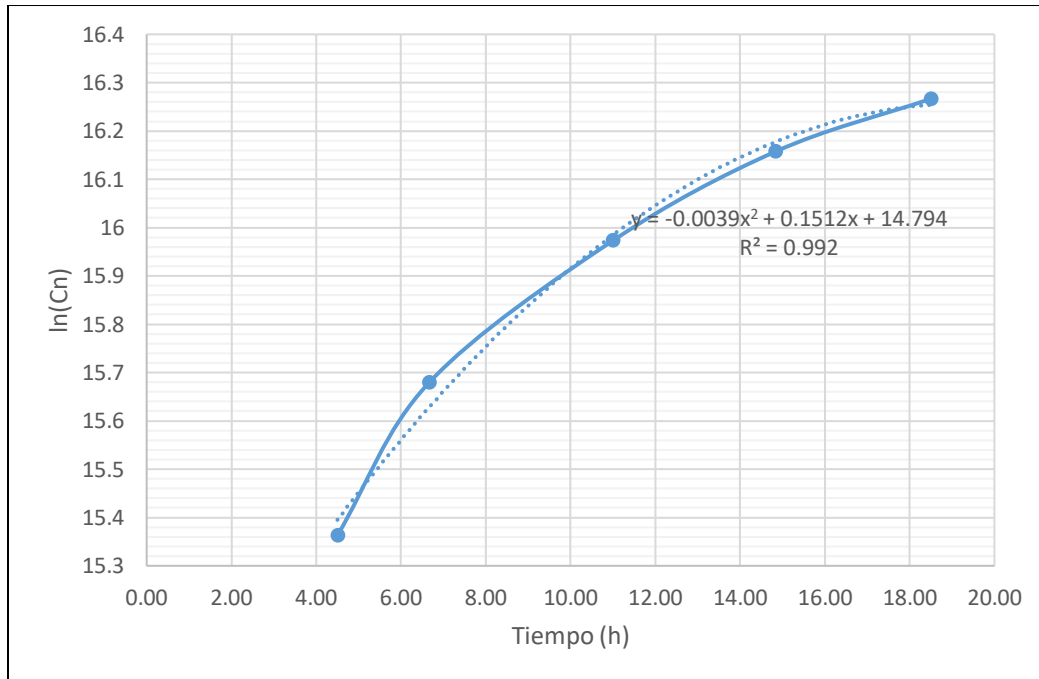


Figura 21. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBPB sin aireación (Fuente: elaboración propia).

Para este experimento, se presenta el ajuste polinómico de la curva del logaritmo natural de la concentración celular respecto al tiempo (con  $R^2 \geq 0.95$ ), así como su derivada (respecto al tiempo) y el valor de  $\mu$  (ver tabla 28).

$$y = -0.0039x^2 + 0.1512x + 14.794 \quad R^2 = 0.992$$

$$\mu = -0.0078t + 0.1512$$

Tabla 28.  $\bar{\mu}$  de *S. cerevisiae* en MCBPB sin aireación.

$t$ (h)	$C_n$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )
4.5000	4,700,000	<b>0.1161</b>	0.10765
6.6667	6,450,000	<b>0.0992</b>	
11.0000	8,650,000	0.0654	
14.8333	10,400,000	0.0355	
18.5000	11,600,000	0.0069	

**2) Velocidad de división promedio ( $\delta$ ):**

$$\mu = 0.301 \cdot \delta$$

$$\delta = \frac{\mu}{0.301}$$

Sustituyendo  $\mu$  en la ecuación anterior, se tiene que:

$$\delta = \frac{0.10765 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.3576 \text{ h}^{-1}$$

**3) Tiempo de duplicación ( $t_d$ ):**

$$t_d = \frac{1}{\delta}$$

Sustituyendo  $\delta$  en la ecuación anterior, se tiene que:

$$t_d = \frac{1}{0.3576 \text{ h}^{-1}} = 2.7964 \text{ h}$$

**4) Números de generaciones ( $n$ ):**

$$n = \frac{\log_{10}(C_n) - \log_{10}(C_{n_0})}{0.301}$$

Sustituyendo  $C_n$  y  $C_{n_0}$ , se tiene que:

$$n = \frac{\log_{10}(11,600,000) - \log_{10}(4,700,000)}{0.301} = 1.3035$$

**5) Concentración celular máxima ( $Cn_{max}$ ):**

La máxima concentración celular obtenida corresponde al ultima valor de concentración celular de la fase exponencial fue:

$$Cn_{max} = 11,600,000 \text{ cel/ml}$$

**6) Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ):**

Los valores de  $r_n$  se obtienen mediante la ecuación:  $r_n = \mu \cdot Cn$ . Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para este experimento (ver tabla 29).

Tabla 29. Valores de $r_n$ para <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB sin aireación.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
4.5000	4,700,000	0.10765	505,955
6.6667	6,450,000		694,342.5
11.0000	8,650,000		931,172.5
14.8333	10,400,000		1,119,560
18.5000	11,600,000		1,248,740

**4.3. Biorreactor con aireación**

A continuación, se muestran la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBP con aireación, obtenida del experimento.

En la figura 22, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBP en biorreactor con aireación, obtenidas del experimento por triplicado. Se observa que el crecimiento celular comienza con la fase exponencial.

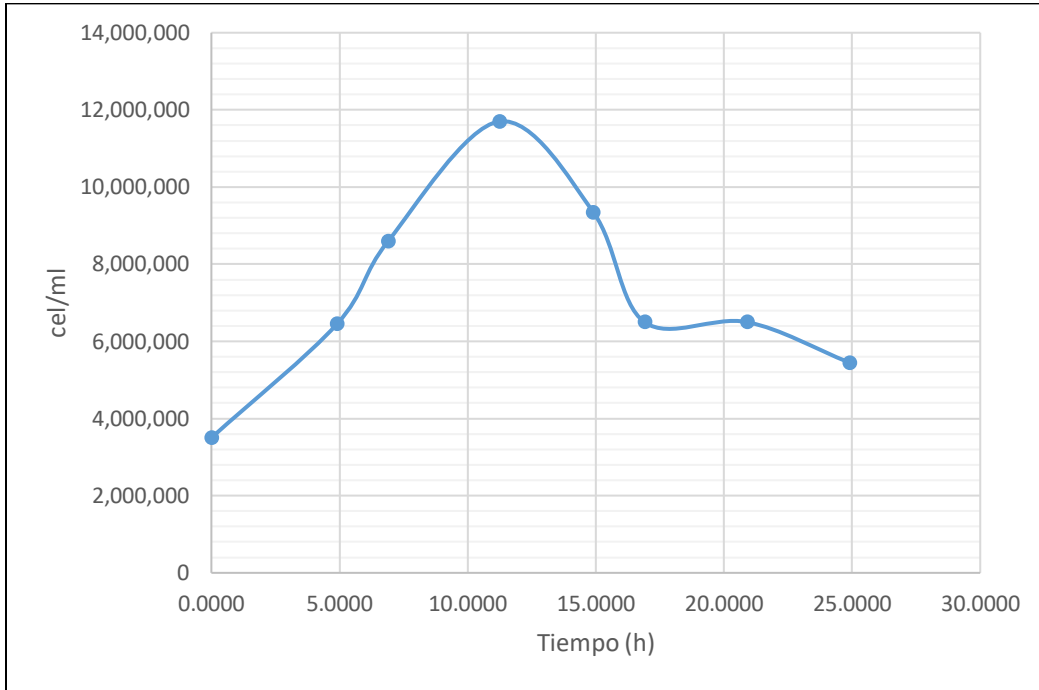


Figura 22. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBP con aireación (Fuente: elaboración propia).

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 2), en la figura 23 se muestra dicha fase correspondiente a la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 22.

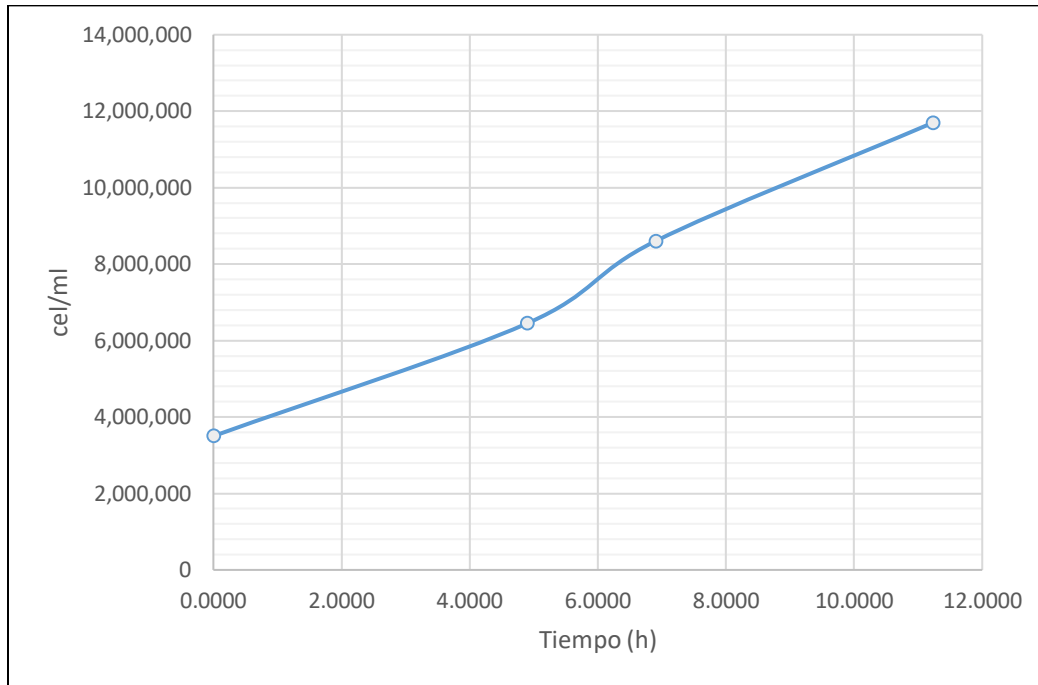


Figura 23. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBPB con aireación (Fuente: elaboración propia).

A partir de los datos representados en la figura 11, se muestra a continuación la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en tal condición metabólica:

#### 4.3.2.1 Parámetros cinéticos en el Biorreactor

##### 1) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ):

Para la determinación del valor de  $\mu$ , se emplea la ecuación 13.

A continuación, en la figura 24 se muestra la gráfica de  $\ln(Cn)$  contra tiempo, empleando los datos de la figura 23, así como su ajuste lineal.



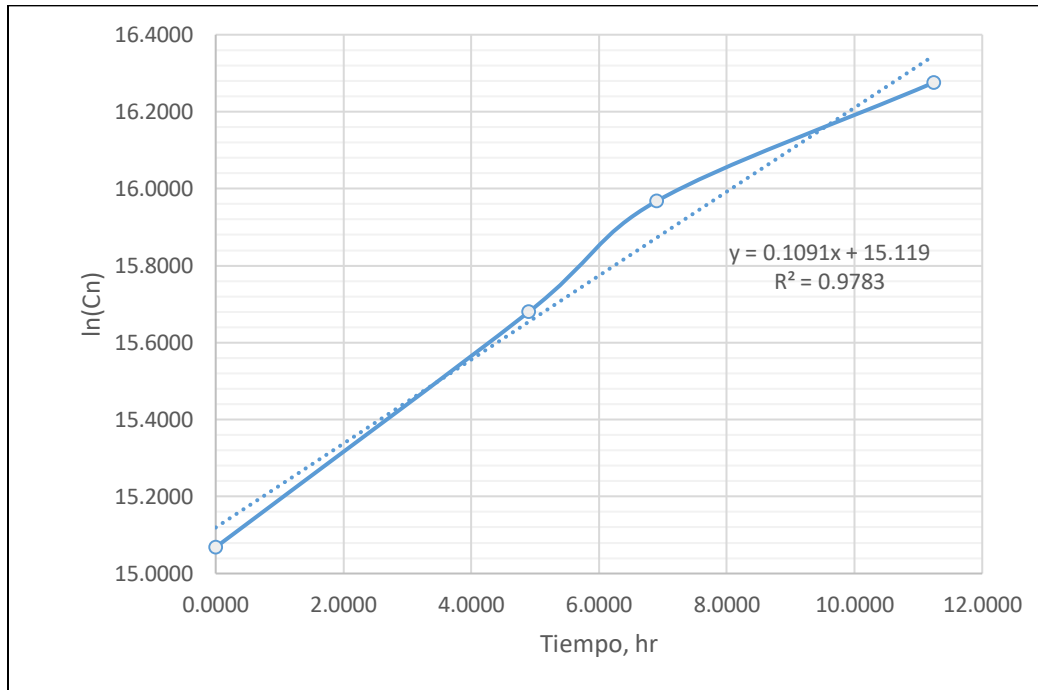


Figura 24. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMS en biorreactor con aireación (Fuente: elaboración propia).

Como se observa en la figura 24, los datos se ajustan al modelo lineal, con un ajuste de  $R^2 = 0.9783$  ( $R^2 \geq 0.95$ ). Dicho esto, la ecuación lineal se representa de la siguiente manera:

$$\ln(Cn) = \underbrace{0.1091t}_{\mu} + \underbrace{15.119}_{\ln(Cn_0)} \quad R^2 = 0.9783,$$

donde  $\mu$  se obtiene directamente de la ecuación anterior, siendo este valor:

$$\mu = 0.1091 \text{ h}^{-1}$$

## 2) Velocidad de división promedio ( $\delta$ ):

$$\mu = 0.301 \cdot \delta$$

$$\delta = \frac{\mu}{0.301}$$

Sustituyendo  $\mu$  en la ecuación anterior, se tiene que:

$$\delta = \frac{0.1091 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.3624 \text{ h}^{-1}$$

**3) Tiempo de duplicación ( $t_d$ ):**

$$t_d = \frac{1}{\delta}$$

Sustituyendo  $\delta$  en la ecuación anterior, se tiene que:

$$t_d = \frac{1}{0.3624 \text{ h}^{-1}} = 2.7593 \text{ h}$$

**4) Números de generaciones ( $n$ ):**

$$n = \frac{\log_{10}(Cn) - \log_{10}(Cn_0)}{0.301}$$

Sustituyendo  $Cn$  y  $Cn_0$ , se tiene que:

$$n = \frac{\log_{10}(11,700,000) - \log_{10}(3,500,000)}{0.301} = 1.7412$$

**5) Concentración celular máxima ( $Cn_{max}$ ):**

La máxima concentración celular obtenida corresponde al último valor de concentración celular de la fase exponencial fue:

$$Cn_{max} = 11,700,000 \text{ cel/ml}$$

**6) Velocidad de crecimiento celular ( $r_n$ ):**

Los valores de  $r_n$  se obtienen mediante la ecuación:  $r_n = \mu \cdot Cn$ . Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para este experimento (ver en la tabla 30).

Tabla 30. Valores de $r_n$ para <i>S. cerevisiae</i> en MCBPB con aireación.			
$t$ (h)	$Cn$ (cel/ml)	$\bar{\mu}$ ( $h^{-1}$ )	$r_n$ (cel/ml·h)
0.0000	3,500,000	0.1091	381,850
4.9000	6,450,000		703,695
6.9000	8,600,000		938,260
11.2333	11,700,000		1,276,470

### 4.3.3 Resumen de los parámetros cinéticos

Resultados finales de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales (MMS), medio de cultivo a base de *Carica papaya* (MCBP) y medio de cultivo a base de papaya en el Biorreactor ver tabla 31.

Tabla 31. Resumen de los parámetros cinéticos promedio de <i>S. cerevisiae</i> en los medios de cultivo.										
Medio de cultivo	Sin aireación					Con aireación				
	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\delta$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)	$n$	$Cn_{max}$ (cel/ml)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\delta$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)	$n$	$Cn_{max}$ (cel/ml)
MMS	0.215 9	0.717 2	1.394 5	3.745 8	150,062,50 0	0.201 1	0.668 2	1.513 5	3.899 8	285,700,00 0
MCBP	0.131 8	0.145 9	9.150 9	1.335 8	8,282,500	0.316 0	1.349 9	0.987 0	4.978 5	207,533,33 3
MCBPB	0.107 6	0.357 6	2.796 4	1.303 5	11,600,000	0.109 1	0.362 4	2.759 3	1.741 2	11,700,000

MMS=Medio Mínimo de Sales, MCBP=Medio de Cultivo a Base de *C. papaya*, MCBPB=Medio de Cultivo Base de Papaya en Biorreactor.  
 $\mu$  = Velocidad específica de crecimiento,  $\delta$  = Velocidad de división promedio,  $n$  = Número de generaciones,  $t_d$  = Tiempo de duplicación,  $Cn_{max}$  = Concentración celular máxima.

## CAPÍTULO V – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y la evaluación de los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo a base de *Carica papaya* y medio mínimo de sales, con y sin aireación, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Los parámetros cinéticos muestran de forma detallada el comportamiento del crecimiento del microorganismo; además, permiten evaluar la eficiencia del crecimiento de dicho microorganismo entre diferentes condiciones metabólicas (por ejemplo: medio de cultivo y disponibilidad de aire).
- La mayor concentración celular máxima ( $Cn_{max}$ ) se obtuvo en el MMS con la aireación, en comparación con el otro medio de cultivo, el cual fue de *C. papaya* (MCBP y MCBPB).
- La  $Cn_{max}$  obtenida en MCBP, MCBPB y MMS fue menor en la ausencia de aire en la realización de las cinéticas, en comparación con las cinéticas realizada en presencia de aire.
- En los casos de MCBP y MCBPB se presenta una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) superior con aireación, además que la velocidad de división promedio ( $\delta$ ).
- El tiempo de duplicación ( $t_d$ ) para los tres casos (MMS, MCBP y MCBPB) en presencia de aire, fue menor lo cual es favorable en la realización de las cinéticas. En comparación con los resultados obtenidos en la ausencia de aire para los tres casos, se concluye que dicho parámetro fue mayor, lo cual significa que el microorganismo tarda más tiempo para reproducirse.

## 5.2 Recomendaciones

- Acidificar el medio de cultivo a base de *Carica papaya*, ya que es propenso a contaminarse por bacterias, pues es un medio rico en nutrientes como azúcares, vitaminas, y minerales. Se recomienda un pH de 4, puesto que dicho microorganismo es capaz de desarrollarse en tales condiciones.
- Proponer concentraciones diferentes para el medio de cultivo preparado a base de *C. papaya*; esto con el fin de identificar aquella en la que *S. cerevisiae* presente mayor crecimiento. Para el caso del medio mínimo de sales, se recomienda emplear la concentración de glucosa (o sacarosa) indicada en la tabla 1 (10g/L).
- Con base en las condiciones evaluadas para el medio de cultivo a base de *C. papaya* y medio mínimo de sales, recolectar la biomasa de *S. cerevisiae* con el fin de determinar su composición nutrimental mediante pruebas bromatológicas: determinación de humedad (secado en estufa de convección forzada), grasas (método de Soxhlet), proteínas (nitrógeno total, mediante el método de Kjeldahl), y cenizas (por secado). Para ello se recomienda preparar grandes volúmenes de medio de cultivo, con el fin de obtener una cantidad adecuada de biomasa (4 gramos para cada prueba).

## REFERENCIAS

- Aquihuatl, M. y Pérez, M. 2004.** Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. México: Casa abierta al tiempo.
- Aranda, J., Salgado, E. y Taillandier, P. 2004.** Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. *Biochem. Eng. J.* 17 (2): 129-140.
- Badillo, V. 2002.** Carica L. vs. Vasconcella St. Hil. (*Caricaceae*) con la rehabilitación de este último. *Ernstia.* 10: 74-79.
- Brock, T. y Madigan, M. 1993.** MICROBIOLOGIA. 6.<sup>a</sup> edición. México: Prentice Hall Hispanoamericana S. A.
- Carrillo, L., Audisio, C., Bejarano, N., Gómez, S., Ancasi, G, y Benitez, M. 2007.** Manual de Microbiología de los Alimentos. Argentina: UNJU, SS Jujuy.
- Carrillo, M., Aguilar, M., Wong, J. y Muñiz, D. 2010.** Producción de biomasa de *Candida utilis* (Henneberg) a partir de melaza. *UNACAR TECNOCENCIA.* 4 (2): 32-40.
- Cervera, P., Clapés, J. y Rigolfas, R. 2004.** Alimentación y dietoterapia. España: McGrawHill.
- Chacón, A. 2004.** Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SPC) en la agricultura y la industria. *Agronomía mesoamericana.* 25 (1): 93-106.
- Gamboa, J., Villarreal, D., Nieto, M. y Maldoñado, M. 2017.** La biomasa microbiana como ingrediente en la nutrición acuícola. *Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola.* pp. 213-263.
- Gómez, M. y Namesny, A. 2008.** Guía de las mejores frutas y hortalizas. España: Ediciones de Horticultura, S. L.
- Jamieson, D. 1992.** *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive response to both hydrogen peroxide and menadione *J. Bacteriol.* 174 (20): 6678-6681.

**Kurozawa, L., Terng, I., Hubinger, M. y Park, K. 2014.** Degradación del ácido ascórbico de papaya durante el secado: Efecto de las condiciones del proceso y el fenómeno de transición vítrea. *Revista de Ingeniería de Alimentos*. 123: 157-164.

**Netsuwan, N. 2013.** Green Papaya Salad Recipe.

**Ojokoh, A. y Uzeh, R. 2005.** Production of *Saccharomyces cerevisiae* biomass in papaya extract medium. *African Journal of Biotechnology*. 4 (11): 1281-1284.

**Palmerín, D., Guevara, L., Villaseñor, F. y Pérez, C. 2011.** Identificación de una levadura para producción de proteína unicelular para consumo humano y determinación de los parámetros cinéticos a nivel de matraces agitados. *Ciencia@UAQ*. 4 (2): 35-46.

**Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. 2004.** Microbiología. 5.<sup>a</sup> edición. España: McGrawHill.

**Rivas, V., Mora, G., Téliz, D. y Mora, A. 2003.** Influencia de variedades y densidades de plantación de papayo (*Carica papaya*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 109-116.

**SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013.** Atlas Agroalimentario. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Primera Edición, México, p. 194.

**SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014.** Avance de siembras y cosechas.

**Suárez, M., Garrido, N. y Guevara, P. 2016.** Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50 (1): 20-28.

**Udomkun, P., Nagle, M., Argyropoulos, D., Mahayothee, B. y Müller, J. 2016.** Enfoque multisensor para mejorar el control óptico de la contracción de la papaya durante el secado. *Journal of Food Engineering*. 189: 82-89.

**United States Department of Agriculture (USDA). 2018.** Full Report (All Nutrients): 09226, Papayas, raw.

**Zumbado, W., Esquivel, P. y Wong, E. 2006.** Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso. *Agronomía mesoamericana*. 17 (2): 151-160.

## ANEXOS

### Material del laboratorio:

- Cámaras de Neubauer
- Cubreobjetos
- Émbolos
- Pipetas graduadas de 0.1ml
- Pipetas graduadas de 1ml
- Pipetas graduadas de 5ml
- Pipetas Pasteur
- Piseta de alcohol
- Pissetas de agua destilada
- Matraces Erlenmeyer de 500ml
- Matraces Erlenmeyer de 1000ml
- Vasos de precipitado de 100ml
- Vasos de precipitado de 250ml

### Sustancias y/o reactivos:

- Buffer pH 5
- Buffer pH 7
- Fosfato dipotásico ( $K_2PO_4$ )
- Sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- Sacarosa
- Sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ )
- Sulfato de hierro ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )

### Materia prima:

- Melaza de caña de azúcar
- Papaya (Fruta)

### Equipo:

- Agitadores de rotación horizontal
- Bombas de aire para pecera
- Microscopios ópticos
- Potenciómetro
- Reguladores de electricidad