



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE MISANTLA

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

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOQUÍMICO**

P R E S E N T A N

**CARLOS GARCÍA PÉREZ
JOSÉ DAVID CONTRERAS MONTALVO**

ASESOR:

M. C. OSWALDO CASTOR ORTIZ ZAMORA

MISANTLA, VERACRUZ

JUNIO, 2019



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

FECHA: 02 de Julio de 2019.

ASUNTO: **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE TESIS PROFESIONAL.**

A QUIEN CORRESPONDA:

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

CARLOS GARCÍA PÉREZ

pasante de la carrera de INGENIERÍA BIOQUÍMICA con No. de Control 152T0048 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 MELAZA 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.



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

FECHA: 02 de Julio de 2019.

ASUNTO: **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE TESIS PROFESIONAL.**

A QUIEN CORRESPONDA:

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

JOSÉ DAVID CONTRERAS MONTALVO

pasante de la carrera de INGENIERÍA BIOQUÍMICA con No. de Control 152T0043 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 MELAZA 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.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco sinceramente y con mucho cariño a:

Mis padres, la Lic. en Biología Dora Anita Pérez Cabrera y Miguel García y Santiago, por brindarnos su amor incondicional; a mi papá por trabajar cada día para que a mi hermano Misael y a mí nunca nos faltara nada, por compartirnos sus anécdotas y consejos, así como por su apoyo en las decisiones que tomáramos; agradezco especialmente a mi mamá, por criarnos a mi hermano y a mí con mucho cariño, por darnos una infancia de lo más feliz, por ser la figura paterna y materna a la vez, por abrir nuestra mente, oídos y ojos en cualquier situación y sobre todo, por ser nuestra mejor amiga.

Al Instituto Tecnológico Superior de Misantla, por disponer de una buena administración y docentes profesionales para impartir las asignaturas correspondientes a cada una de las carreras que dispone para la juventud que desea obtener su título universitario.

A los docentes del Instituto Tecnológico Superior de Misantla que nos impartieron asignaturas, cursos y talleres, así como a los docentes que nos compartieron sus conocimientos, orientación, experiencias y motivación durante nuestra formación como Ingenieros Bioquímicos.

Nuestra Jefa de Carrera, la Ing. Bioquímica Aracely Romano García, por brindarnos orientación y apoyo incondicional, profesional y humano, así como por motivarnos con mucho gusto.

Nuestro asesor, el M. C. Oswaldo Castor Ortiz Zamora, por asignarnos esta investigación y orientarnos durante su realización, por demostrarnos que somos capaces de realizar cualquier actividad que se nos presente, con dedicación e ingenio.

La Ing. Aracely Romano García y al Lic. Leoncio Laiz Trujillo, por realizar la revisión y corrección de esta tesis, para garantizar un documento formal.

Mis compañeros José David Contreras Montalvo, Fernando Sánchez García y Niver Isaac Quintero Gutiérrez, por su esfuerzo y ayuda durante el desarrollo experimental de esta investigación, así como por brindarme su sincera amistad y solidaridad.

Carlos García Pérez.

Agradezco sinceramente:

Y especialmente a mis padres, Humberta Montalvo Hernández y Armando Contreras Alcántara, por todo el apoyo que me han brindado, tanto económico como moral, y sobre todo por creer en mí en todo momento, por siempre impulsarme a seguir hacia adelante.

Al Instituto Tecnológico Superior de Misantla por abrirme las puertas del conocimiento durante mi carrera, así como también a la administración y docentes profesionales, quienes día a día se esfuerzan y dan lo mejor para nosotros los estudiantes.

A todos los docentes del Instituto Tecnológico Superior de Misantla, pero en especial, a los miembros de la academia de Ingeniería Bioquímica, por brindarme los conocimientos necesarios para mi formación académica y profesional.

A nuestra Jefa de Carrera, la Ing. Bioquímica Aracely Romano García, por siempre estar al pendiente de nosotros, por darnos lo mejor de ella y por su incondicional apoyo moral, profesional y humano.

A nuestro asesor, el M. C. Oswaldo Castor Ortiz Zamora, quien siempre estuvo al pendiente de nosotros, le agradezco por asignarnos un trabajo de investigación de máximo esfuerzo.

A mis compañeros de trabajo de investigación, Carlos García Pérez, Fernando Sánchez García y Niver Isaac Quintero Gutiérrez, por la gran ayuda que nos dimos mutuamente, ya que fueron muchas horas de trabajo en el laboratorio, día y noche; cómo voy a extrañar esas noches de convivencia a la hora de la cena, en las noches de las cinéticas.

José David Contreras Montalvo.

DEDICATORIAS.

Le dedico este trabajo a mis padres, la Lic. en Biología Dora Anita Pérez Cabrera y Miguel García y Santiago, por apoyarnos a mi hermano Misael y a mí durante nuestra formación preescolar, primaria, secundaria, media superior y superior, por asegurarse que obtuviéramos el título universitario que escogimos, por educarnos y hacernos personas de bien, por inculcarnos valores y fortalezas para superar sabiamente cualquier reto que se nos presente y construir nuestro futuro con base en nuestros ideales. Muchas gracias mamá y papá.

Carlos García Pérez.

Este trabajo está dedicado a mis padres, Humberta Montalvo Hernández y Armando Contreras Alcántara, quienes siempre lo dieron todo para que yo tuviera la oportunidad de seguirme superando, y que, a pesar de no haber tenido esta oportunidad, se esforzaron y trabajaron diariamente para poderme dar la oportunidad de ser alguien en esta vida, por educarme de la mejor manera posible para ser una persona de bien y por brindarme siempre su incondicional apoyo moral. Muchas gracias mamá y papá.

José David Contreras Montalvo.

RESUMEN.

Los nutrientes representan la principal fuente de energía para los seres vivos (tales como los seres humanos y animales) y son indispensables para preservar su salud. Se han estudiado alternativas sustentables para la producción de nutrientes, siendo un ejemplo la producción de biomasa celular a partir de microorganismos no patógenos en medios de cultivo a base de sustratos renovables (como las frutas o desechos orgánicos) y subproductos de procesos industriales, cuyo costo es menor en comparación con los medios de cultivo definidos.

Por este motivo, se evaluó el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo a base de melaza en matraces (MCBMM) con y sin aireación (2.4 L/min), empleando el medio mínimo de sales en matraces (MMSM) como medio de cultivo de control. Las concentraciones para MCBMM y MMSM fueron 30 g/L y 100 g/L sacarosa, respectivamente. Como complemento de la evaluación de los parámetros cinéticos, se estudió el crecimiento de este microorganismo en un biorreactor empleando el medio mínimo de sales (MMSB).

El inóculo del microorganismo en cada uno de los experimentos fue de 3,500,000 cel/ml. Los experimentos en matraces se realizaron por triplicado; en el biorreactor, estos fueron únicos. Se monitoreó la concentración celular cada cuatro horas mediante conteo directo en cámara de Neubauer. A partir de las curvas de crecimiento celular de cada experimento, se obtuvieron los parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad de división promedio (δ), tiempo de duplicación (t_d), número de generaciones (n), y concentración celular máxima obtenida (Cn_{max}). Finalmente, se evaluaron los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* considerando el suministro de aire, la condición anaerobia y la condición aerobia.

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

ÍNDICE DE CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	III
RESUMEN.....	IV
CAPÍTULO I – PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación.....	2
1.4. Objetivos.....	3
1.4.1. Objetivo general.....	3
1.4.2. Objetivos específicos.....	3
1.5. Hipótesis.....	4
1.6. Alcances.....	4
1.7. Limitaciones.....	4
CAPÍTULO II – MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Levaduras.....	5
2.1.1. Generalidades.....	5
2.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.1.3. Recuperación de levadura.....	6
2.1.4. Factores de crecimiento y desarrollo de la levadura.....	7
2.2. Fermentación.....	7
2.2.1. Tipos de Fermentaciones.....	8
2.2.1.1. Alcohólica.....	8
2.2.1.2. Láctica.....	9
2.3. Medio mínimo de sales.....	9
2.4. Caña de Azúcar.....	10
2.4.1. Características generales.....	10
2.4.2. Subproductos.....	10
2.4.2.1. Cachaza.....	10
2.4.2.2. Bagazo de caña.....	11
2.4.2.3. Melaza de caña de azúcar.....	11
2.5. Crecimiento celular.....	13
2.5.1. Curva de crecimiento celular.....	13
2.5.2. Fases del crecimiento celular.....	13

2.5.3. Métodos de medición del crecimiento.	14
2.6. Parámetros cinéticos.....	18
2.6.1. Determinación de los parámetros cinéticos.	19
2.6.1.1. Número de generaciones (n).	19
2.6.1.2. Velocidad de división promedio (δ).....	20
2.6.1.3. Tiempo de duplicación (t_d).	21
2.6.1.4 Velocidad de crecimiento celular (r_n).....	21
2.6.1.5. Velocidad específica de crecimiento celular (μ).	22
CAPÍTULO III – MATERIALES Y MÉTODOS.	24
3.1. Búsqueda y revisión bibliográfica.	25
3.2. Elaboración del diseño experimental.	25
3.3. Obtención de la materia prima.	27
3.4. Selección del microorganismo.	27
3.5. Reactivación del microorganismo.	27
3.6. Realización de las cinéticas microbianas.	28
3.7. Determinación y evaluación de los parámetros cinéticos.	28
3.8. Análisis estadístico.	29
CAPÍTULO IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1. Medio mínimo de sales.	30
4.1.1. Sin aireación.	30
4.1.1.1. Matraces.	30
4.1.1.1.1. Parámetros cinéticos.	32
4.1.1.2. Biorreactor.	38
4.1.1.2.1. Parámetros cinéticos.	40
4.1.2. Con aireación.	42
4.1.2.1. Matraces.	42
4.1.2.1.1. Parámetros cinéticos.	44
4.1.2.2. Biorreactor.	47
4.1.2.2.1. Parámetros cinéticos.	48
4.1.3. Resumen de los parámetros cinéticos.	51
4.2. Medio de cultivo a base de melaza.....	52
4.2.1. Matraces.....	52
4.2.1.1. Sin aireación.....	52
4.2.1.1.1. Parámetros cinéticos.	53
4.2.1.2. Con aireación.	57

4.2.1.2.1. Parámetros cinéticos	59
4.2.2. Resumen de los parámetros cinéticos.	62
4.3. Evaluación de los parámetros cinéticos.	62
4.3.1. Suministro de aire en los medios de cultivo.	65
4.3.2. Condición anaerobia.	67
4.3.3. Condición aerobia.	68
4.4. Análisis estadístico.	69
4.4.1. Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores.	69
CAPÍTULO V – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	72
5.1. Conclusiones.	72
5.2. Recomendaciones.....	73
REFERENCIAS.	74
ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Morfología de colonias microbianas (Prescott <i>et al</i> , 2004).....	5
Figura 2. Melaza de caña de azúcar.....	11
Figura 3. Curva de proliferación típica de una población microbiana.	13
Figura 4. Cámara de Neubauer.	15
Figura 5. Esquema general del trabajo.....	24
Figura 6. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación.	31
Figura 7. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación.....	31
Figura 8. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación.....	32
Figura 9. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, repetición 1.....	33
Figura 10. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB.	38
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB sin aireación.	39
Figura 12. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB sin aireación.	39
Figura 13. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB sin aireación (ln).....	40
Figura 14. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación.....	42
Figura 15. Curvas de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación.....	43
Figura 16. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación.	43
Figura 17. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB con aireación.	47
Figura 18. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB con aireación.	48
Figura 19. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB con aireación (ln).....	49
Figura 20. Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación.	52
Figura 21. Curvas de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación.	52
Figura 22. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación.....	53
Figura 23. Medio de cultivo a base de melaza en matraz con aireación.	57
Figura 24. Curvas de crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM con aireación.	58
Figura 25. Fase exponencial de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM con aireación.....	58
Figura 26. Gráfica de probabilidad normal del experimento.	71

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición del MMS.	9
Tabla 2. Composición de la melaza de caña de azúcar.....	12
Tabla 3. Diseño experimental: Diseño factorial de dos factores.	26
Tabla 4. Composición del MMS empleado.	27
Tabla 5. Diseño experimental para ANOVA de dos factores para los valores de μ	29
Tabla 6. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, R1.	34
Tabla 7. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, R2.	35
Tabla 8. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, R3.	35
Tabla 9. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, R1.	37
Tabla 10. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, R2.	37
Tabla 11. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSM sin aireación, R3.	37
Tabla 12. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSB sin aireación.....	42
Tabla 13. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R1.	44
Tabla 14. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R2.	44
Tabla 15. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R3.	45
Tabla 16. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R1.	46
Tabla 17. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R2.	47
Tabla 18. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R3.	47
Tabla 19. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSB con aireación.....	49
Tabla 20. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSB con aireación.....	50
Tabla 21. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MMS.....	51
Tabla 22. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación, R1.....	54
Tabla 23. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación, R2.....	54
Tabla 24. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación, R3.....	54
Tabla 25. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación, R1.....	56
Tabla 26. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación, R2.....	56

Tabla 27. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM sin aireación, R3.....	56
Tabla 28. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM con aireación, R1.....	61
Tabla 29. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM con aireación, R2.....	61
Tabla 30. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM con aireación, R3.....	61
Tabla 31. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM.	62
Tabla 32. Resumen de los parámetros cinéticos promedio de <i>S. cerevisiae</i> en los medios de cultivo.....	62
Tabla 33. Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> con base en el suministro de aire.....	66
Tabla 34. Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> con base en la condición anaerobia.....	67
Tabla 35. Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> con base en la condición aerobia.....	68
Tabla 36. Velocidades específicas de crecimiento celular (h^{-1}) de <i>S. cerevisiae</i>	69

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 aerobio facultativo dado que posee la capacidad para poder desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Hoy en día se busca el empleo de técnicas sustentables, para 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 satisfacer necesidades humanas sin afectar al medio ambiente. Algunos ejemplos de fuentes de carbono renovables para el crecimiento de microorganismos son los subproductos de procesos industriales, también conocidos como productos de tercera generación, tal es el caso de la melaza.

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, δ : 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, μ : 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 de bajo costo, que favorezcan el crecimiento de los microorganismos. Existen estudios sobre el uso de medios de cultivo a base de sustratos de bajo costo para la producción de biomasa celular, tal como la melaza y han demostrado ser capaces de propiciar el crecimiento de *S. cerevisiae* (Carrillo *et al*, 2010); sin embargo, en la mayoría de dichos estudios no se contempla el análisis del comportamiento cinético del microorganismo (velocidad de crecimiento celular), el cual puede ser expresado mediante los parámetros cinéticos.

1.3. Justificación.

Saccharomyces 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 como 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);

este microorganismo es aerobio facultativo, por lo que puede ser cultivado en condición aerobia y anaerobia, lo cual permite evaluar la eficiencia de su desarrollo en ambas condiciones y en diferentes medios de cultivo.

Una de las alternativas al uso de medios de cultivo definidos de costo elevado para la generación de biomasa microbiana de *S. cerevisiae* es la melaza, dado que es un subproducto de la producción del azúcar de caña, de bajo costo, de alta disponibilidad y a su vez, sustentable. En su composición se encuentran los nutrientes básicos que permiten el desarrollo de microorganismos tales como fuentes de carbono (azúcares), minerales (sales) y compuestos nitrogenados (aminoácidos) y vitaminas. Para el estudio de la velocidad de crecimiento celular del microorganismo, se emplean los parámetros cinéticos, ya que permiten estudiar la velocidad del crecimiento celular en condiciones de cultivo específicas.

Por lo tanto, mediante los parámetros cinéticos se evalúa el desarrollo de *S. cerevisiae* en un medio de cultivo a base de melaza con y sin aireación, para determinar en cuál de las dos condiciones se tiene mayor velocidad de crecimiento, así como mayor concentración celular (biomasa). A su vez, se emplea el medio mínimo de sales como medio de cultivo de control, para comparar el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo propuesto (a base de melaza) en comparación con un medio de cultivo definido.

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo general.

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

1.4.2. Objetivos específicos.

- Determinar los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medios de cultivo a base de melaza y medio mínimo de sales, con y sin aireación.
- Mediante la evaluación de los parámetros cinéticos, determinar la eficiencia del desarrollo del microorganismo en:
 - Los medios de cultivo a base de melaza y medio mínimo de sales con aireación, en comparación con los parámetros cinéticos correspondientes a dichos medios de cultivo sin aireación.

- Los medios de cultivo a base de melaza, tomando como referencia a los parámetros cinéticos correspondientes al medio mínimo de sales en matraces, tanto en condición aerobia como anaerobia.
- Medio mínimo de sales en un biorreactor, en comparación con los parámetros cinéticos correspondientes a los obtenidos en matraces.

1.5. Hipótesis.

Mediante la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en diferentes condiciones metabólicas (tipo de medio de cultivo y disponibilidad de aire), 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 melaza y medio mínimo de sales, así como el cultivo y monitoreo continuo del microorganismo. 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 los equipos de agitación y aireación para los medios de cultivo en los que se cultivó a *S. cerevisiae*, así como para realizar los conteos celulares.

1.7. Limitaciones.

A pesar que la biomasa de *S. cerevisiae* es de gran importancia por su aceptación para consumo humano y animal, la cantidad obtenida al término de cada experimento fue mínima (entre uno y dos gramos); por este motivo, se omite el análisis de la cantidad generada de biomasa en los medios de cultivo estudiados, en su lugar, se analiza la concentración celular máxima obtenida (Cn_{max}), ya que es directamente proporcional a la cantidad de biomasa.

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 μm de ancho y de 2 a más 20 μm de longitud; esto depende de la especie y edad del microorganismo, así como de la nutrición y algunos otros factores.

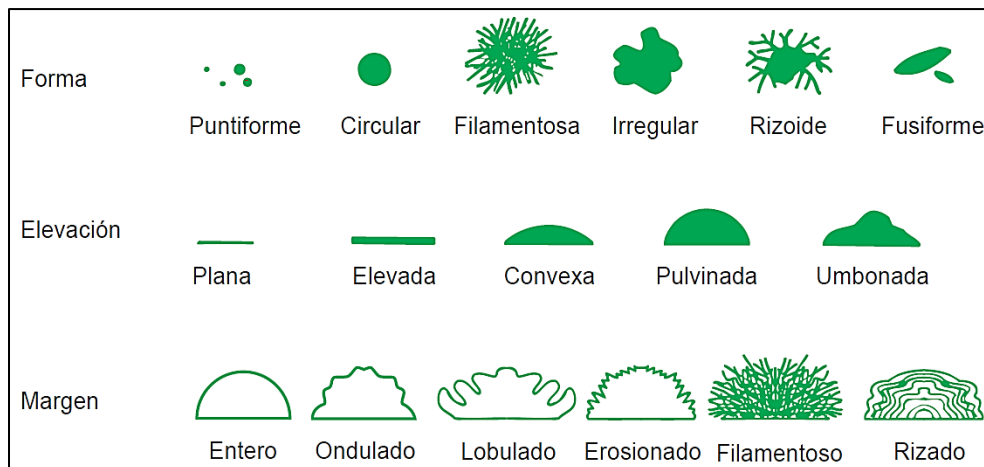


Figura 1. Morfología de colonias microbianas (Prescott *et al*, 2004).

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.

En 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 plasmoptisis 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. Fermentación.

La fermentación es un proceso catabólico de la oxidación de sustancias orgánicas para poder producir otros compuestos orgánicos, así como energía. Los procesos de la fermentación son realizados por las levaduras y las bacterias que están en ausencia de oxígeno.

En el proceso de fermentación así como en la respiración (con presencia de oxígeno), los microorganismos realizan la glucólisis para obtener energía a partir de la oxidación de los azúcares o fuente de carbono; sin embargo, en la fermentación, la oxidación de dichos compuestos no es completa, pues la cadena de transporte de electrones (fosforilación oxidativa) del NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) no se ve involucrada, debido a la ausencia de oxígeno; esto implica el uso de otros compuestos que actúen como aceptores finales de electrones para oxidar el NADH a NAD^+ , tales como el piruvato o el acetaldehído (ambos son derivados del sustrato que se ha oxidado anteriormente), los cuales poseen poco poder oxidante.

Los carbohidratos son los principales sustratos que se llegan a fermentar, pero en algunas bacterias pueden ser fermentadas por otros compuestos como ácidos orgánicos, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Algunas fuentes de carbono que se fermentan son la glucosa, la fructosa, la maltosa, la sacarosa y la lactosa, los cuales se llegan a obtener de la caña de azúcar, las melazas, los jugos de las frutas, la remolacha y el suero de la leche.

Las fermentaciones ocurren naturalmente a condiciones ambientales en las frutas y vegetales. Por lo contrario, en la industria, estos sustratos, granos y leche con microorganismos específicos se depositan en biorreactores o fermentadores, para producir diversos alimentos, además de medicamentos, bebidas alcohólicas, derivados lácteos, encurtidos vegetales, glicerina, ácidos, alcoholes y cetonas, entre otros.

2.2.1. Tipos de Fermentaciones.

2.2.1.1. Alcohólica.

Este tipo de fermentación es realizada principalmente por levaduras que producen etanol y CO_2 . Cuando hay oxígeno, las levaduras realizan la respiración, crecen, oxidan completamente la glucosa y así obtienen el ATP, pero en condiciones de anaerobiosis, estos microorganismos fermentables de azúcares como la glucosa pueden generar etanol, lactato, entre otros. La glucosa se transforma en ácido pirúvico, siguiendo la secuencia de reacciones del glucólisis, y luego, el ácido pirúvico se transforma en acetaldehído mediante la enzima piruvato Descarboxilasa, seguidamente el acetaldehído se convierte en etanol por medio de la enzima alcohol-deshidrogenasa.

La fermentación alcohólica o etílica se usa principalmente para la producción de los vinos, cervezas y bebidas destiladas. Adicionalmente, la celulosa de la madera y de los residuos

agrícolas se convierten en azúcares fermentables mediante una hidrólisis previa con ácidos inorgánicos o con enzimas y, luego se obtiene el bioetanol por fermentación alcohólica.

De acuerdo con los sustratos y las cepas, en las fermentaciones por levaduras se obtienen otros alcoholes como propanol, butanol, isobutanol, pentanol, y además glicerina, ácido succínico, ésteres, aldehídos, cetonas, aminas y compuestos de azufre, entre otros.

2.2.1.2. Láctica.

Este tipo de fermentación es realizada por las bacterias *Lactobacilacea* y *Enterobacteriaceae*, algunos protozoos y también en la obtención de ácido láctico a partir de azúcares. En la fermentación láctica el piruvato producido en la glucólisis se transforma en ácido láctico mediante la enzima lactato-deshidrogenasa. El ácido láctico contribuye a la acidez y sabor de productos lácteos, vegetales, legumbres, cereales y carnes; además, permite mejorar su estabilidad microbiológica e inocuidad, ya que restringe el crecimiento de otras bacterias que causan su descomposición.

Las bacterias lácticas se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas según los productos obtenidos. Las bacterias homofermentativas producen más del 90% del ácido láctico a partir de la glucosa, además, produce una pequeña cantidad de alcohol, anhídrido carbónico y acetoina, dependiendo de la disponibilidad del oxígeno. En el proceso heterofermentativo, se obtiene ácido láctico, alcohol y ácido acético o anhídrido carbónico (Puerta, 2010).

2.3. Medio mínimo de sales.

El medio mínimo de sales (MMS), medio mínimo basal o medio mínimo, es un medio de cultivo químicamente definido, empleado generalmente para el crecimiento de microorganismos poco exigentes nutricionalmente tales como las bacterias; su composición se muestra en la tabla 1 (Aquiahuatl *et al*, 2004).

Componente	g/L
Glucosa	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
K ₂ HPO ₄	2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
pH	6.5-7.0

Los componentes nutritivos de éste medio de cultivo consisten en una fuente de carbono (como glucosa, lactosa u otra azúcar) y una serie de iones como Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} y NH_4^+ , presentes como sales inorgánicas. Para que el microorganismo pueda desarrollarse en tal medio, debe ser capaz de sintetizar todos los componentes orgánicos esenciales para propiciar su desarrollo, tales como amino ácidos, purinas, pirimidinas, azúcares, vitaminas y ácidos grasos. Si el microorganismo es capaz de sintetizar dichos componentes en este medio de cultivo, se denomina como protótrofa o de tipo silvestre; en caso contrario se denomina auxótrofo, pues no es capaz de sintetizar uno o más de los componentes mencionados, por lo que deben añadirse al medio de cultivo (Klug *et al*, 2006).

Tales características hacen al medio mínimo de sales un medio ideal como medio de cultivo de control para evaluar el crecimiento de microorganismos específicos (tal es el caso de la levadura *S. cerevisiae*) en determinados medios de cultivo.

2.4. Caña de Azúcar.

2.4.1. Características generales.

La caña de azúcar es un pasto muy grande, que se emparenta con el sorgo y el maíz, en el tallo se llega formar y acumular un jugo rico en sacarosa, compuesto que después de ser extraído y cristalizado forma el azúcar.

Llega a formar espiguillas pequeñas agrupadas en rosetas y rodeadas por unas largas fibras que pueden llegar a ser sedosas. Se conocen ya varias variedades cultivadas que se diferencian por el color y la altura de los tallos. El tallo de la caña de azúcar contiene el tejido esponjoso y dulce del cual se extrae el conocido producto, la azúcar (ICA *et al*, 1981).

2.4.2. Subproductos.

2.4.2.1. Cachaza.

Es el residuo que se elimina durante el proceso de la clarificación del jugo de la caña durante la fabricación del azúcar. Es muy rico en fosforo, así como calcio, nitrógeno y materia orgánica, pero es pobre en potasio. Se llega a usar principalmente como un abono, ya que mejora algunas propiedades físicas y ácidas del suelo, aunque además se emplea en la alimentación de ganado vacuno y en la obtención de ceras y aceites (Leeson *et al*, 2000).

2.4.2.2. Bagazo de caña.

Es aquel desecho que se queda después de la molienda de la caña de azúcar. Está formado por todo un conjunto de partículas de diferentes dimensiones o tamaños cuyo promedio esta entre alrededor de 2 a 2.5, el resto es de sólidos solubles e insolubles. Es utilizado normalmente como combustible en las calderas que le dan energía a los ingenios azucareros (Leeson *et al*, 2000).

2.4.2.3. Melaza de caña de azúcar.

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

Las mieles finales, las melazas o melaza “blackstrap” (ver figura 2), muchos autores suelen definir las como los residuos de la cristalización de un proceso final del azúcar de los cuales no se puede obtener más producto del azúcar por métodos físicos. La denominación de la melaza se aplica al afluyente final obtenida en la preparación del azúcar mediante el proceso de la cristalización repetida. En el proceso de la evaporación y el de la cristalización, se llega a repetir usualmente hasta tres veces, donde el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no puedan permitir una cristalización adicional de la sacarosa (Swan *et al*, 1990).



Figura 2. Melaza de caña de azúcar.

La melaza es una mezcla que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y así compuestos solubles como en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar.

Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (ver tabla 2). Estos compuestos no fermentables reductores del cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por el calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y aminocompuestos (Honig, 1974).

Tabla 2. Composición de la melaza de caña de azúcar.		
COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63 % p/p
	Azúcar reductores	3-5 % p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8 % p/p
	Agua	16%
	Grasas	0.40 %
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fosforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenidos de aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48.86 ppm
	Ácido pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
Fuente: Tellez, 2004., Yopez, 1995.		

2.5. Crecimiento celular.

2.5.1. 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).

2.5.2. 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.

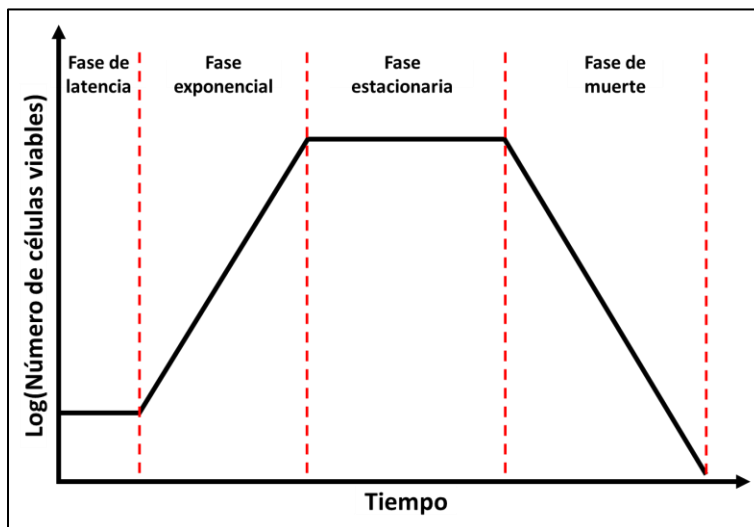


Figura 3. Curva de proliferación típica de una población microbiana.

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.

2.5.3. 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).

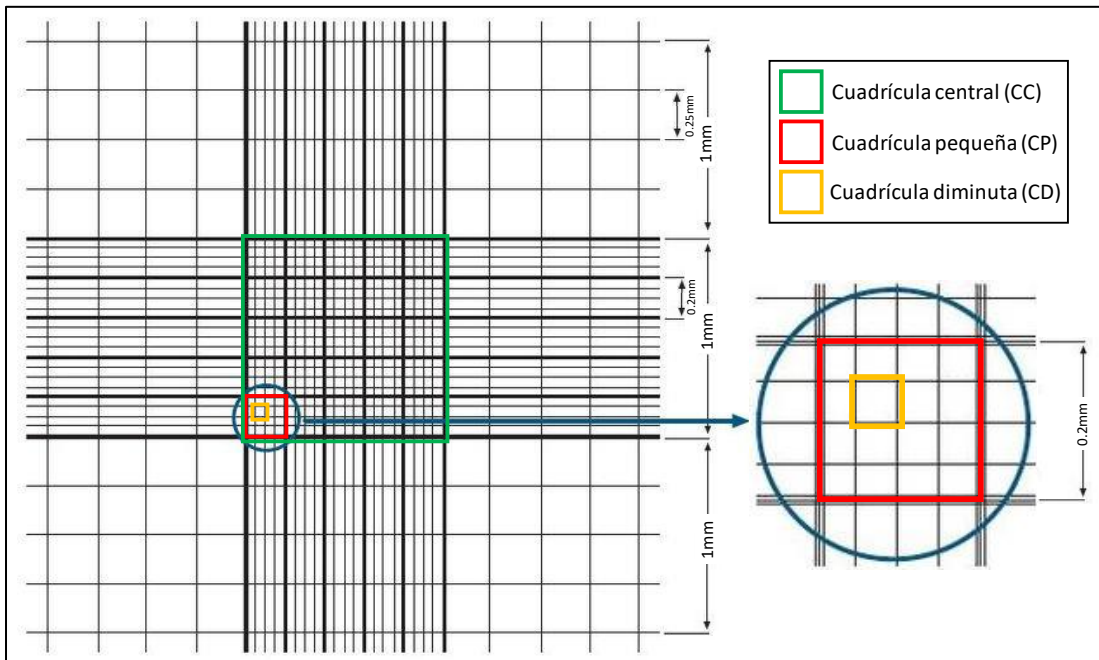


Figura 4. Cámara de Neubauer.

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 0.2×0.2 mm), cada uno dividido en 4×4 cuadros diminutos (CD); el área de CC es de 1 mm^2 , mientras que el espacio entre dicha área y el cubreobjetos es de 0.1 mm, lo cual da como resultado un volumen de conteo de 0.1 mm^3 , o bien, 1×10^{-4} 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 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 mm^2), ml^{-1} .

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

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

Por ejemplo, si se realizó una dilución con 1 ml de muestra y 2 ml 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, atmosfera, 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 ésta 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 nitrato reductores 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).

2.6. Parámetros cinéticos.

Con base en lo descrito por Lee en 2001, 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 (parámetros cinéticos), tales como:

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

$$r_n = \text{Velocidad de crecimiento celular (cel/ml}\cdot\text{h)}.$$

$$n = \text{Numero de generaciones.}$$

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

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

$$t_d = \text{Tiempo de duplicación (h)}.$$

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.

2.6.1. Determinación de los parámetros cinéticos.

2.6.1.1. 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 $Cn_0 \cdot 2$, 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} :

$$\begin{aligned}
 Cn &= Cn_0 \cdot 2^n \\
 \log_{10} [Cn &= Cn_0 \cdot 2^n] \\
 \log_{10} (Cn) &= \log_{10} (Cn_0 \cdot 2^n) \\
 \log_{10} (Cn) &= \log_{10} (Cn_0) + \log_{10} (2^n) \\
 \log_{10} (Cn) &= \log_{10} (Cn_0) + n \cdot \log_{10} (2) \\
 n \cdot \log_{10} (2) &= \log_{10} (Cn) - \log_{10} (Cn_0) \\
 n &= \frac{\log_{10} (Cn) - \log_{10} (Cn_0)}{\log_{10} (2)} \\
 \boxed{n &= \frac{\log_{10} (Cn) - \log_{10} (Cn_0)}{0.301}} & (1)
 \end{aligned}$$

2) Aplicar \log_2 :

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

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

2.6.1.2. Velocidad de división promedio (δ).

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:

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

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:

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

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

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

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

2.6.1.3. 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

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

2.6.1.4 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

$$r_n \cdot dt = d(Cn)$$

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

$$r_n \cdot t = Cn - Cn_0;$$

de la última expresión, se despeja C_n :

$$\boxed{C_n = r_n \cdot t + C_{n_0}} \quad (8)$$

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:

$$r_n = \mu \cdot C_n.$$

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 (C_n), el cual se multiplica por un factor de proporcionalidad (μ).

2.6.1.5. Velocidad específica de crecimiento celular (μ).

La velocidad específica de crecimiento celular puede representarse de la siguiente forma (ver ecuaciones 9 y 10).

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

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:

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

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

integrando la expresión anterior, se obtiene la ecuación 11:

$$\mu \int_0^t dt = \int_{C_{n_0}}^{C_n} \frac{d(C_n)}{C_n}$$

$$\boxed{\mu \cdot t = \ln(C_n) - \ln(C_{n_0})}. \quad (11)$$

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 μ .

Partiendo de la ecuación 11, se despeja $\ln(Cn)$; esto da como resultado la ecuación 13:

$$\boxed{\underbrace{\ln(Cn)}_y = \underbrace{\mu}_{b_1} \cdot \underbrace{t}_x + \underbrace{\ln(Cn_0)}_{b_0}}, \quad (13)$$

de la cual, la pendiente (b_1) indica directamente el valor de μ .

CAPÍTULO III – MATERIALES Y MÉTODOS.

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

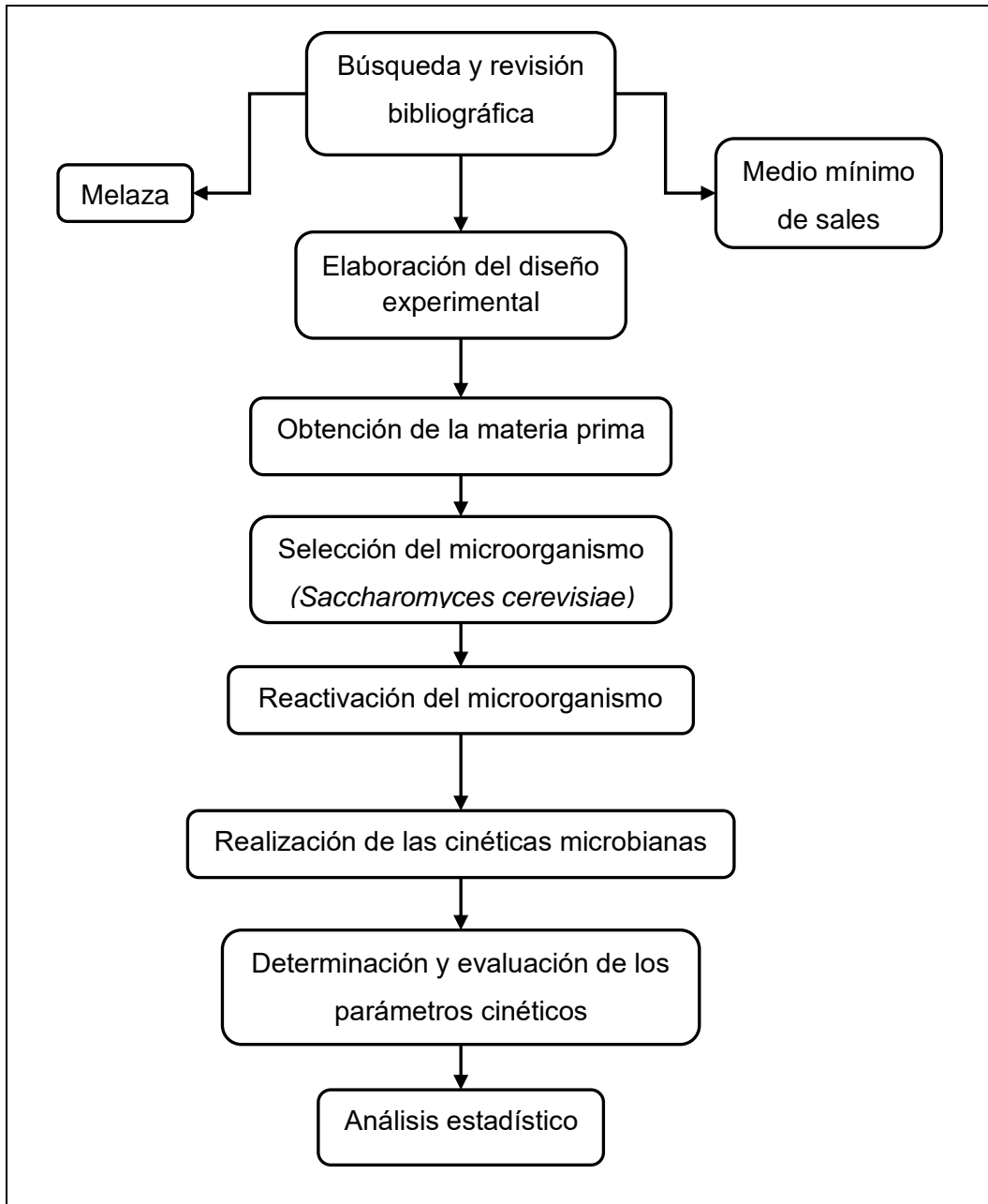


Figura 5. Esquema general del trabajo.

3.1. Búsqueda y revisión bibliográfica.

Se investigaron referencias acerca del crecimiento de *S. cerevisiae* en medio de cultivo a base de melaza, para identificar la composición de dicho medio y a su vez tomar como base las mejores condiciones en las que se desarrolló dicho microorganismo.

3.2. Elaboración del diseño experimental.

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 (Gutiérrez *et al*, 2010). Para la elaboración del diseño experimental, se decidió evaluar el crecimiento de *S. cerevisiae* en medios de cultivo a base de melaza y medio mínimo de sales (dos medios de cultivo) en matraces de 1 L con 800 ml de medio de cultivo, con y sin aireación (dos formas de airear: 0 y 2.4 L/min), haciendo tres repeticiones para cada condición. El análisis anterior se representa de la siguiente manera:

Número total de
experimentos en = (2 Medios de cultivo)(2 Formas de airear)(3 Repeticiones)=12.
matraces

Como se aprecia, se realizarán 4 tratamientos (número de combinaciones posibles entre los factores) por triplicado:

T1: Medio Mínimo de Sales en matraz sin aireación (0 L/min).

T2: Medio Mínimo de Sales en matraz con aireación (2.4 L/min).

T3: Medio de Cultivo a base de Melaza en matraz sin aireación (0 L/min).

T4: Medio de Cultivo a base de Melaza en matraz con aireación (2.4 L/min).

La variable de respuesta para cada experimento es la velocidad específica de crecimiento celular μ (de la cual derivan otros parámetros cinéticos de importancia, tales como δ y t_d), misma que es obtenida a partir de cada curva de crecimiento celular.

Como complemento de la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae*, se decidió realizar cinéticas de crecimiento celular del microorganismo en un biorreactor de vidrio, empleando 2.4 L de medio mínimo de sales, sin aireación y con aireación (2.4 L/min de aire), con la finalidad de corroborar que el desarrollo del microorganismo sea similar al obtenido en matraces; por este motivo, no se realizaron repeticiones a los experimentos realizados en el biorreactor.

Con base en lo anterior, se representa el número de experimentos realizados en el biorreactor:

Número total de experimentos en el biorreactor = (1 Medios de cultivo) (2 Formas de airear) = 2.

Ambos experimentos (tratamientos), se describen de la siguiente manera:

T5: Medio Mínimo de Sales en Biorreactor sin aireación (0 L/min).

T6: Medio Mínimo de Sales en Biorreactor con aireación (2.4 L/min).

En la tabla 3 se muestra el diseño experimental general de trabajo, en el cual se describe el número de repeticiones realizados para cada tratamiento. En cada repetición, se obtuvo una curva de crecimiento celular (ver 3.6.) para posteriormente, obtener los parámetros cinéticos. Para la evaluación de los parámetros cinéticos, se decidió utilizar los valores de μ correspondientes a los experimentos en matraces (ver tabla 5); no se incluyen los valores de μ correspondientes a los experimentos realizados en el biorreactor, ya que éstos son únicos (no se cuenta con repeticiones experimentales).

Medio de cultivo	Aireación (L/min)			
	0		2.4	
Medio Mínimo de Sales en Matraz (MMSM)	T1	Repetición 1	T2	Repetición 1
		Repetición 2		Repetición 2
		Repetición 3		Repetición 3
Medio de Cultivo a Base de Melaza en Matraz (MCBMM)	T3	Repetición 1	T4	Repetición 1
		Repetición 2		Repetición 2
		Repetición 3		Repetición 3
Medio Mínimo de Sales en Biorreactor (MMSB)	T5	Repetición 1	T6	Repetición 1

Como se observa en la tabla 3, el diseño experimental es un diseño factorial de dos factores, pues los factores son las variables a analizar: el “medio de cultivo” (con tres niveles: MMSM, MCBMM y MMSB) y la “aireación” (con dos niveles: 0 y 2.4 L/min).

3.3. Obtención de la materia prima.

La melaza se consiguió en la Asociación Ganadera del municipio de Misantla; dicha melaza poseía un valor de 80 °Brix, es decir, por cada 100 g de melaza, hay 80 g de sólidos disueltos (azúcares). El medio mínimo de sales se preparó con los reactivos disponibles en el Laboratorio de Química del ITSM (ver tabla 4).

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 del microorganismo.

Las concentraciones empleadas para el medio de activación a base de melaza fue 30 g/L (Carillo *et al*, 2010); cabe mencionar que no se acidificó dicho medio de cultivo. El medio mínimo de sales (MMS) se utilizó como medio de control; la cantidad de sales y fuente de carbono que se emplearon se describen en la tabla 4. Cabe señalar que se sustituyó la glucosa por sacarosa (ver tabla 1), debido a su alta disponibilidad y que la concentración correspondiente se cambió de 10 a 100 g/L, para proveer al medio más fuente de carbono para el microorganismo.

Componente	g/L
Sacarosa	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0
K ₂ PO ₄	2.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
pH	6.5-7.0

Los medios de cultivo se esterilizaron en la autoclave, cumpliendo con las condiciones estándares (1 bar y 121 °C, durante 15 min); posteriormente, se aclimataron hasta alcanzar una temperatura tolerable al tacto. Para la inoculación de *S. cerevisiae* (reactivación), se adicionaron 15 g del mismo en 400 ml de cada uno de los dos medios de cultivo. Los matraces de activación se colocaron en un agitador a 250 rpm, durante un tiempo aproximado de 4 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 melaza y medio mínimo de sales fueron 30 g/L y 100 g/L sacarosa, respectivamente. Para el experimento en matraces de 1 L, se prepararon 800 ml de medio de cultivo; en el caso del experimento en el biorreactor de 3 L, se preparó 2.4 L de medio de cultivo.

Posteriormente, éstos se esterilizaron en la autoclave. La cantidad inoculada de *S. cerevisiae* (tomada de los matraces de reactivación) a cada uno de los matraces, así como al biorreactor fue de 3,500,000 cel/ml.

Para todos los experimentos (en matraces y en biorreactor) la aireación de los medios de cultivo, se utilizaron bombas de aire para pecera con flujo de 2.4 L/min de aire; se estableció una agitación de 250 rpm, a temperatura ambiente. La concentración celular se monitoreó cada 4 horas, mediante conteo directo en cámara de Neubauer, para la graficación de las curvas de crecimiento. La duración promedio de cada cinética microbiana fue de 3 a 5 días.

3.7. Determinación y evaluación de los parámetros cinéticos.

Se cultivó *S. cerevisiae* en medios de cultivo a base de melaza en matraz (MCBMM), medio mínimo de sales en matraz (MMSM) y en biorreactor (MMSB), y se identificó la fase exponencial de sus curvas de crecimiento. Con estos datos, se determinaron los parámetros cinéticos: Velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad de división promedio (δ), 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 evaluar dichos parámetros, y así determinar la eficiencia del crecimiento celular, considerando:

- a) La condición aerobia (suministro de aire) para los tres medios de cultivo (MMSM, MCBMM y MMSB), tomando como referencia su condición anaerobia (sin aireación),
- b) La condición anaerobia de MCBMM y MMSB, tomando como referencia a MMSM, y
- c) La condición aerobia de MCBMM y MMSB, tomando como referencia a MMSM.

3.8. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los experimentos, se decidió realizar un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, empleando como variable de estudio (variable respuesta) la velocidad específica de crecimiento celular (μ), ya que a partir de este parámetro cinético derivan otros parámetros cinéticos, tales como δ y t_d . Esto con el fin de determinar si los valores de la variable dependiente μ , dependen de dos factores (medios de cultivo y aireación), o de la interacción entre estos. Para ello, se emplean los valores de las velocidades específicas de crecimiento celular obtenidas en cada uno de los seis tratamientos (ver tabla 5). Debido a que no se cuentan con repeticiones para el experimento en el biorreactor (tratamientos T5 y T6), no se incluyen dentro del ANOVA de dos factores.

Tabla 5. Diseño experimental para ANOVA de dos factores para los valores de μ .				
Medio de cultivo	Aireación (L/min)			
	0		2.4	
Medio Mínimo de Sales en Matraz (MMSM)	T1	μ_1	T2	μ_1
		μ_2		μ_2
		μ_3		μ_3
Medio de Cultivo a Base de Melaza en Matraz (MCBMM)	T3	μ_1	T4	μ_1
		μ_2		μ_2
		μ_3		μ_3

CAPÍTULO IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en medio de cultivo a base de melaza en matraz (MCBMM) y en medio mínimo de sales en biorreactor (MMSB), con y sin aireación, se utilizó el medio mínimo de sales en matraz (MMSM) como medio de cultivo de control. Para los medios de cultivo en matraces, se realizaron los experimentos por triplicado; en el caso del biorreactor, los experimentos fueron únicos (se realizaron una vez), para así disponer de valores comparativos.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de acuerdo al medio de cultivo empleado, siendo éstos la condición de aireación (sin aireación y con aireación), la condición de cultivo (matraz y biorreactor) y los parámetros cinéticos correspondientes.

Es importante mencionar que, dada la gran cantidad de resultados y 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.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae*, se decidió utilizar el MMS en matraz (MMSM) 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 melaza en matraz (MCBMM) y medio mínimo de sales en biorreactor (MMSB).

4.1.1. Sin aireación.

4.1.1.1. Matraces.

En la figura 6 se muestran los cultivos de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación; en todas las cinéticas microbianas realizadas, el contenido de los matraces se mantuvo mezclado gracias a los agitadores de rotación horizontal. 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 MMSM sin aireación.

En la figura 7, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, obtenidas del experimento por triplicado; su comportamiento es similar, lo cual indica que el crecimiento del microorganismo es específico en tales condiciones.

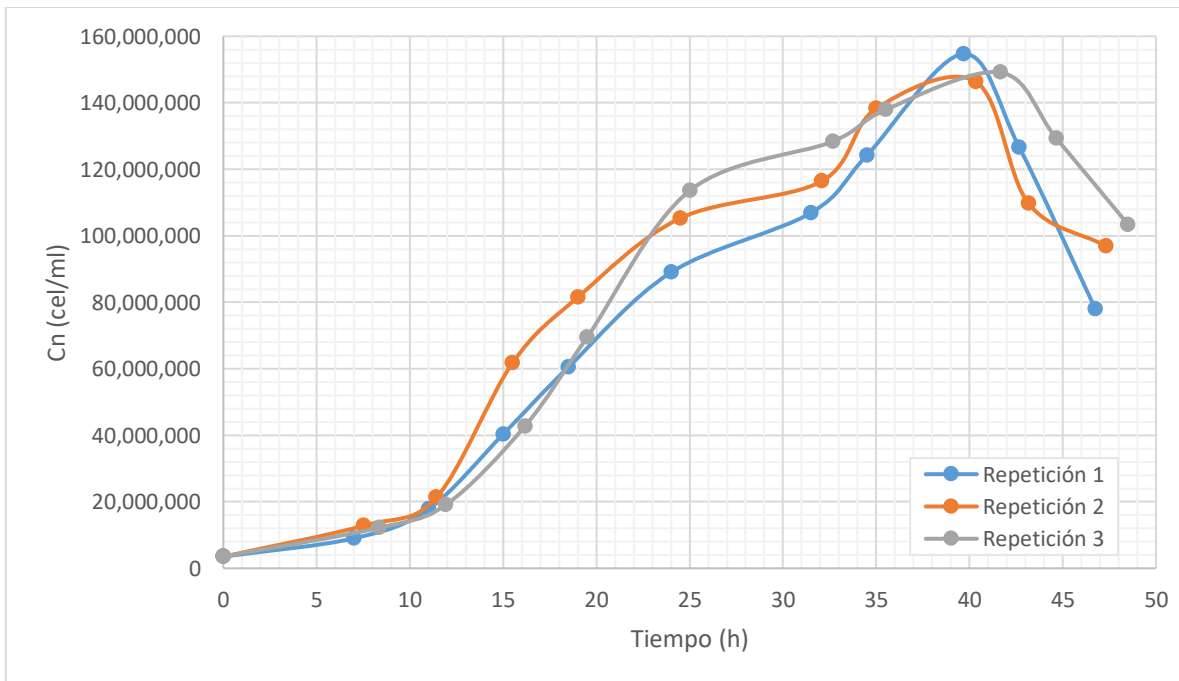


Figura 7. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación.

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.

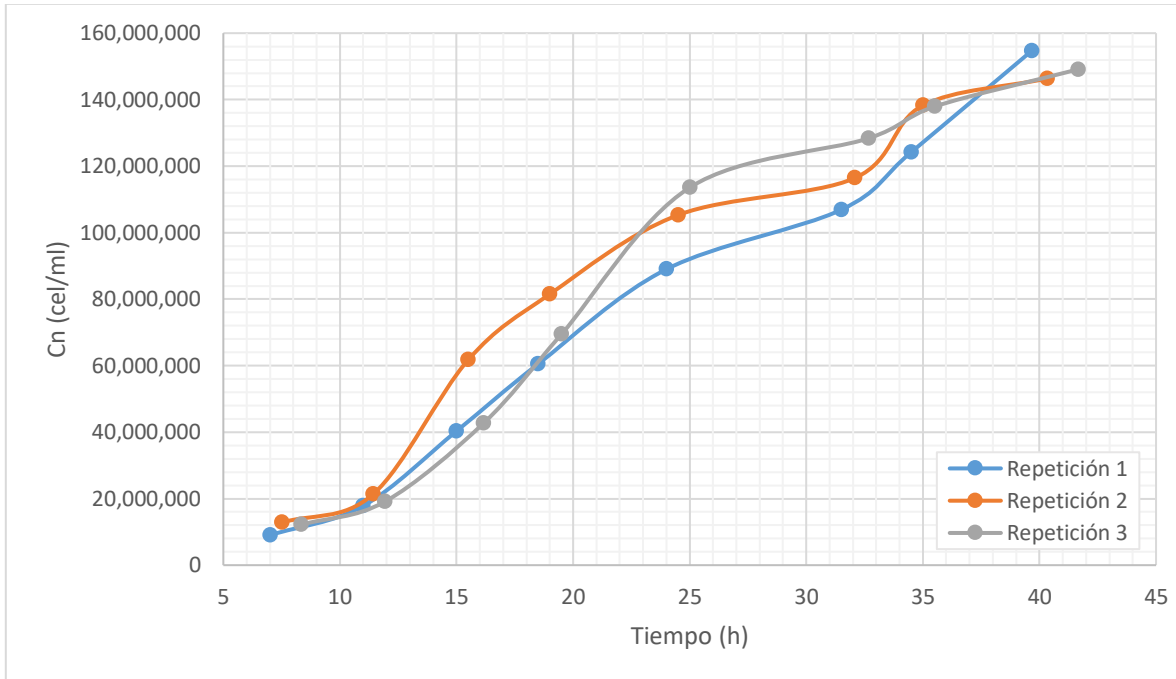


Figura 8. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación.

4.1.1.1.1. Parámetros cinéticos.

A partir de los puntos de cada curva (repetición del experimento) de la figura 8, se muestra a continuación la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae*:

1) Velocidad específica de crecimiento (μ):

Para la determinación del valor de μ , se emplea la siguiente ecuación lineal:

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

Esto implica calcular el logaritmo natural de las concentraciones celulares ($\ln(C_n)$) en cada uno de los tiempos de la fase exponencial, y su posterior graficación: $\ln(C_n)$ contra tiempo.

Dicha ecuación 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.

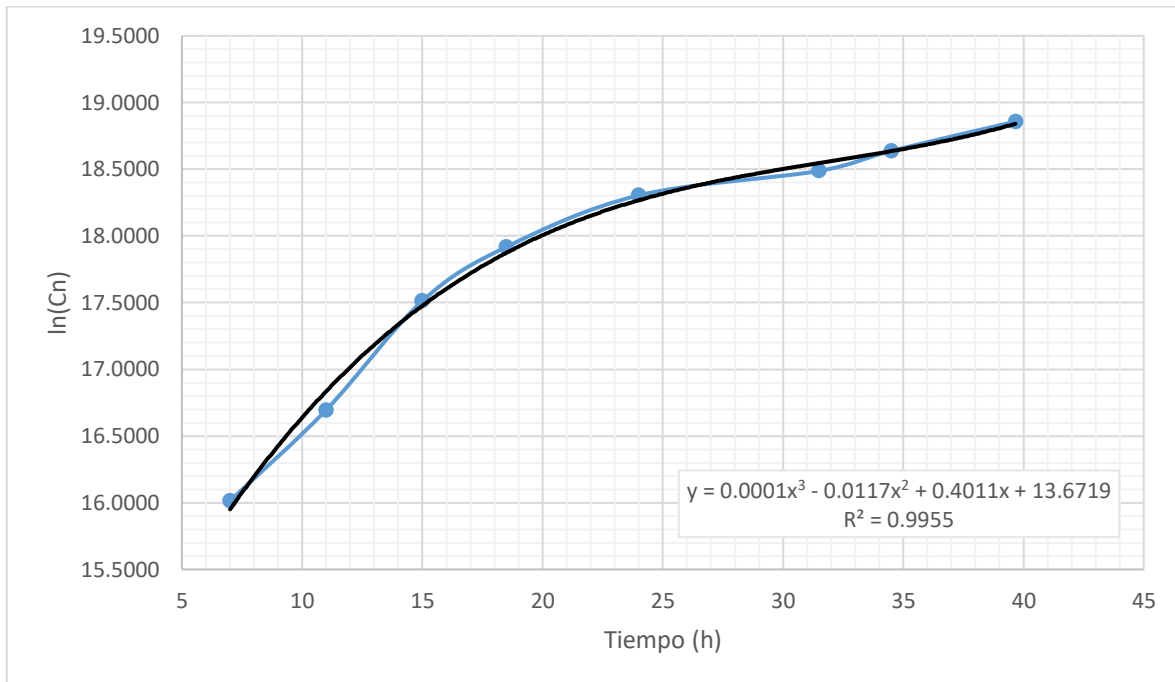


Figura 9. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, repetición 1.

Posteriormente, se deriva el ajuste polinómico y se evalúa la ecuación obtenida para calcular los valores de μ a cada tiempo de la fase exponencial. Se promedian los valores más altos de μ , dado que éstos son representativos al inicio la fase exponencial, e indican la máxima velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) para estas condiciones de crecimiento de *S. cerevisiae*.

Repetición 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, de la repetición 1 (R1):

$$y = 0.0001x^3 - 0.0117x^2 + 0.4011x + 13.6719 \quad R^2 = 0.9955,$$

la cual puede representarse de la siguiente manera:

$$\ln(Cn) = 0.0001t^3 - 0.0117t^2 + 0.4011t + 13.6719. \quad (14)$$

Al derivar la ecuación 14 respecto al tiempo, se obtiene la ecuación 15:

$$\mu = \frac{d(\ln(Cn))}{dt} = 0.0003t^2 - 0.0234t + 0.4011, \quad (15)$$

con la que pueden obtenerse los valores de μ a los distintos tiempos de la fase exponencial.

En la tabla 6, se muestran los puntos de la fase exponencial de la repetición 1 (tiempos y concentraciones celulares), así como los valores de μ obtenidos al evaluar la ecuación 15 con los tiempos de dicha tabla. Se seleccionaron los valores más altos de μ (en negritas) para promediarlos ($\bar{\mu}$).

t (h)	Cn (cel/ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
7.0000	9,012,500	0.2520	0.2160
11.0000	17,820,000	0.1800	
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 las repeticiones 2 (R2) y 3 (R3), mostrando dichos valores en las tablas 7 y 8, respectivamente.

Repetición 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 7. $\bar{\mu}$ de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, R2.

t (h)	Cn (cel/ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
7.5167	12,812,500	0.2565	0.2181
11.4167	21,297,500	0.1796	
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	

Repetición 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 8. $\bar{\mu}$ de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, R3.

t (h)	Cn (cel/ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
8.3333	12,162,500	0.2299	0.2135
11.9167	19,065,000	0.1972	
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 las repeticiones correspondientes.

2) Velocidad de división promedio (δ):

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

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

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

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

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

3) Tiempo de duplicación (t_d):

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

Para las tres repeticiones 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 las tres repeticiones 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 último valor de concentración celular de la fase exponencial para cada repetición 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 las repeticiones (ver tablas 9, 10 y 11).

Tabla 9. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, R1.

t (h)	Cn (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 10. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, R2.

t (h)	Cn (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 11. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación, R3.

t (h)	Cn (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

4.1.1.2. Biorreactor.

En la figura 10 se muestra el cultivo de *S. cerevisiae* en el biorreactor con medio mínimo de sales (MMSB). El biorreactor cuenta con varios orificios, los cuales se taparon con tapones de algodón y venda para evitar su contaminación; para la toma de muestras del cultivo se acercó un encendedor a uno de los orificios para destaparlo, y así tomar una muestra (con una jeringa con manguera delgada) preservando un área aséptica, debido a la convección de aire generada por la flama.



Figura 10. Cultivo de *S. cerevisiae* en MMSB.

En la figura 11, se muestra la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSB sin aireación, obtenida del experimento único. Se observa que el crecimiento celular comienza con la fase exponencial y tiene una duración aproximada de 12 horas.

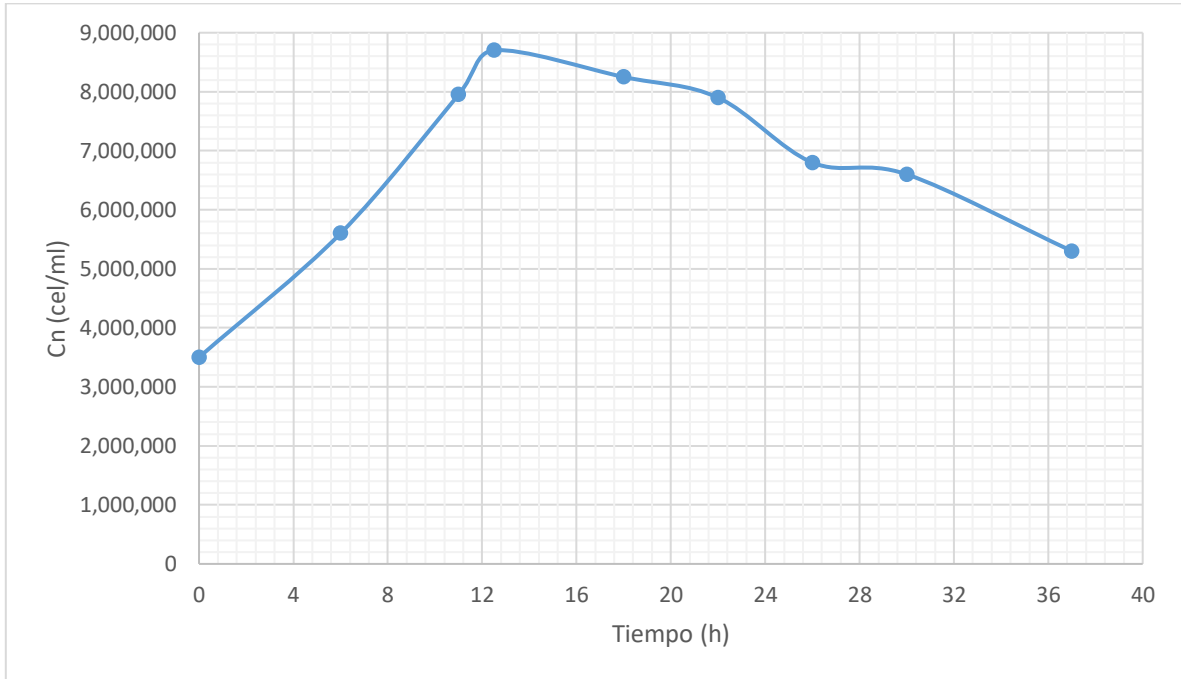


Figura 11. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSB sin aireación.

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 12 se muestra dicha fase correspondiente a la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* mostrada en la figura 11.

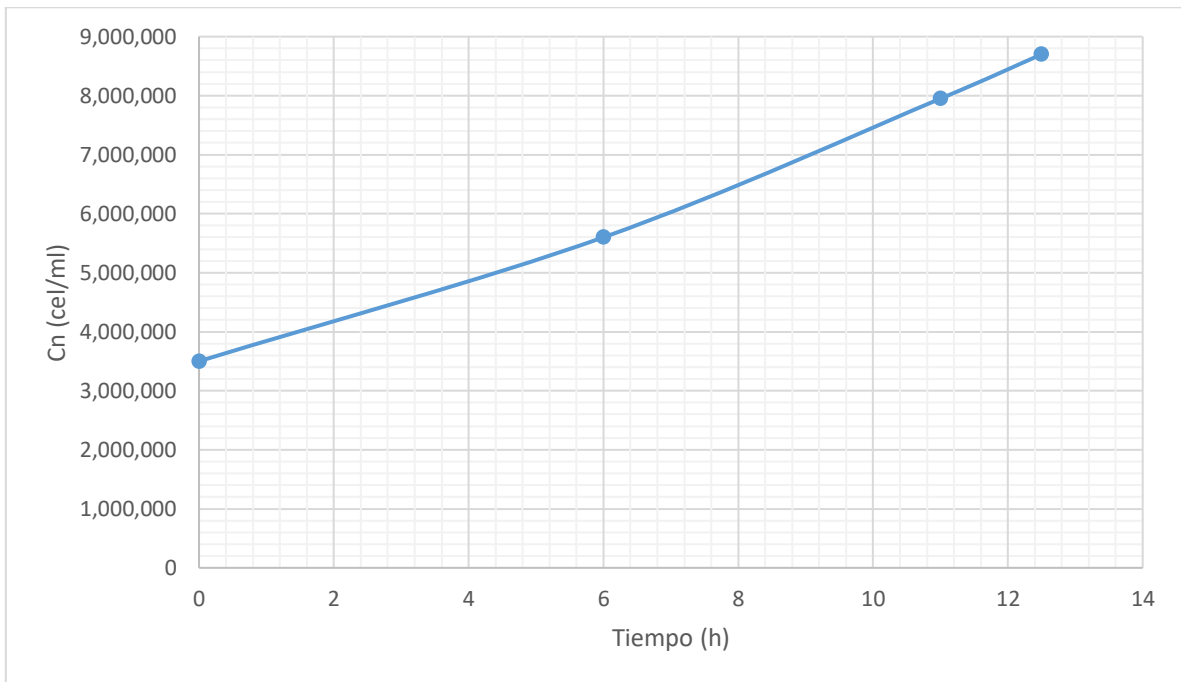


Figura 12. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSB sin aireación.

4.1.1.2.1. Parámetros cinéticos.

A partir de los puntos representados en la figura 12, se muestra a continuación la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en tal condición metabólica:

1) Velocidad específica de crecimiento (μ):

Para la determinación del valor de μ , se emplea la ecuación 13.

$$\underbrace{\ln(C_n)}_y = \underbrace{\mu}_{b_1} \cdot \underbrace{t}_x + \underbrace{\ln(C_{n_0})}_{b_0}. \quad (13)$$

Es necesario graficar $\ln(C_n)$ contra tiempo, y realizar el ajuste lineal a la curva resultante; esto se representa en la figura 13. Este modelo sólo puede emplearse cuando los datos se ajustan al modelo lineal con una $R^2 \geq 0.95$.

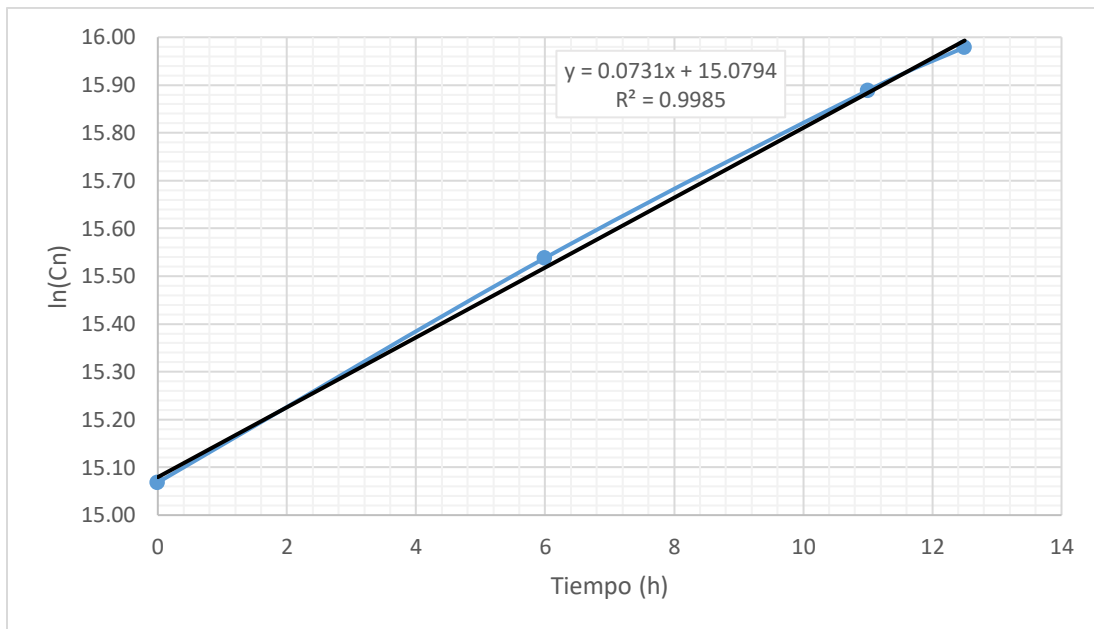


Figura 13. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSB sin aireación (ln).

Como se observa en la figura 13, los datos se ajustan al modelo lineal, con un ajuste de $R^2 = 0.9985$ ($R^2 \geq 0.95$). Dicho esto, la ecuación lineal se representa de la siguiente

manera:

$$\ln(C_n) = \underbrace{0.0731}_\mu t + \underbrace{15.0794}_{\ln(C_{n_0})} \quad R^2 = 0.9985,$$

donde μ se obtiene directamente de la ecuación anterior, siendo:

$$\mu = 0.0731 \text{ h}^{-1}.$$

2) Velocidad de división promedio (δ):

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

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

Sustituyendo μ en la ecuación anterior, se tiene que:

$$\delta = \frac{0.0731 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.2429 \text{ h}^{-1}.$$

3) Tiempo de duplicación (t_d):

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

Sustituyendo δ en la ecuación anterior, se tiene que:

$$t_d = \frac{1}{0.2429 \text{ h}^{-1}} = 4.1169 \text{ h}.$$

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:

$$n = \frac{\log_{10}(8,700,000) - \log_{10}(3,500,000)}{0.301} = 1.3138.$$

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

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

$$C_{n_{max}} = 8,700,000 \text{ cel/ml}.$$

6) Velocidad de crecimiento celular (r_n):

Los valores de r_n se obtienen mediante la ecuación: $r_n = \mu \cdot C_n$. Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para este experimento (ver tabla 12).

t (h)	C_n (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
0.0000	3,500,000	0.0731	255,850
6.0000	5,600,000		409,360
11.0000	7,950,000		581,145
12.5000	8,700,000		635,970

4.1.2. Con aireación.

4.1.2.1. Matrices.

En la figura 14 se muestran los cultivos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales en matraces (MMSM) y en condición aerobia; para el suministro de aire se utilizaron bombas de aire para pecera con flujo volumétrico de 2.4 L/min. Dentro de 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 se realizó con el fin de evitar el paso de microorganismos externos y con ello, la contaminación de los medios de cultivo.

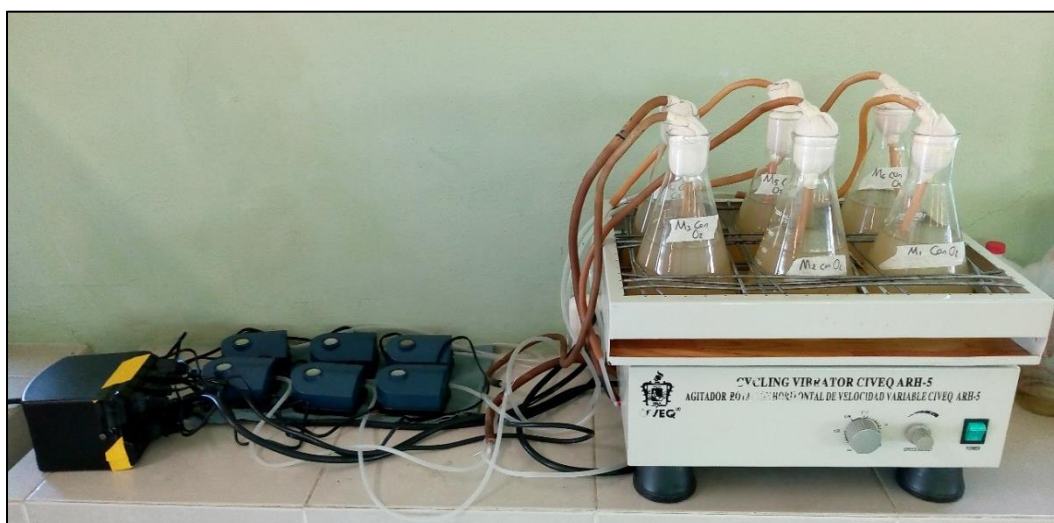


Figura 14. Cultivo de *S. cerevisiae* en MMSM con aireación.

En la figura 15, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSM con aireación, obtenidas del experimento por triplicado. Se observa un comportamiento similar entre dichas curvas, lo cual indica que el crecimiento de este microorganismo es específico para estas condiciones.

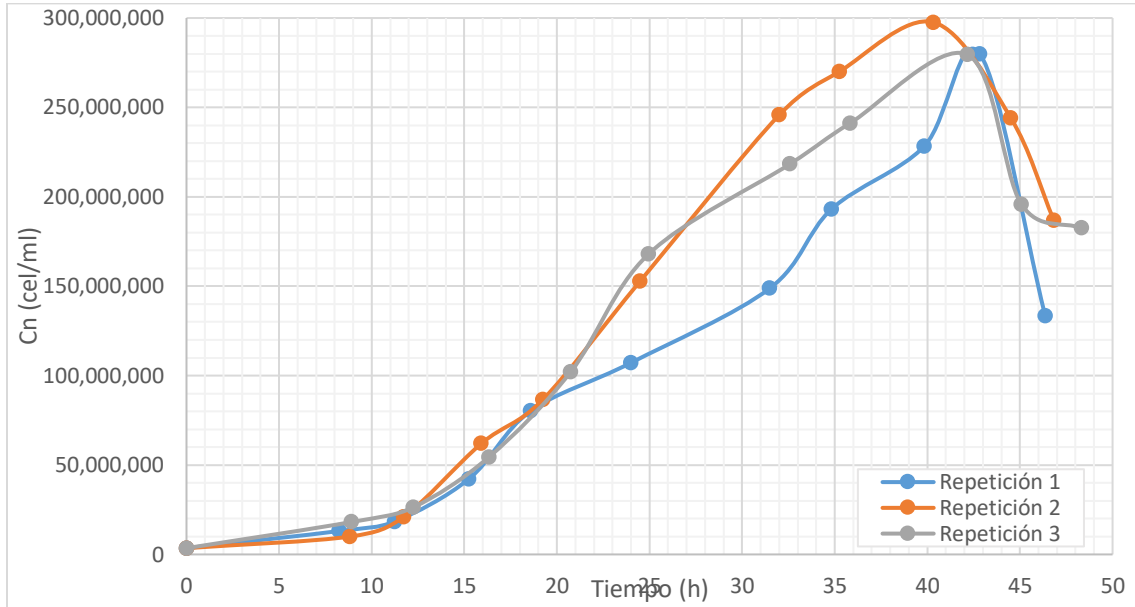


Figura 15. Curvas de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MMSM con aireación.

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 16 se muestran dichas fases correspondientes a cada una de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 15.

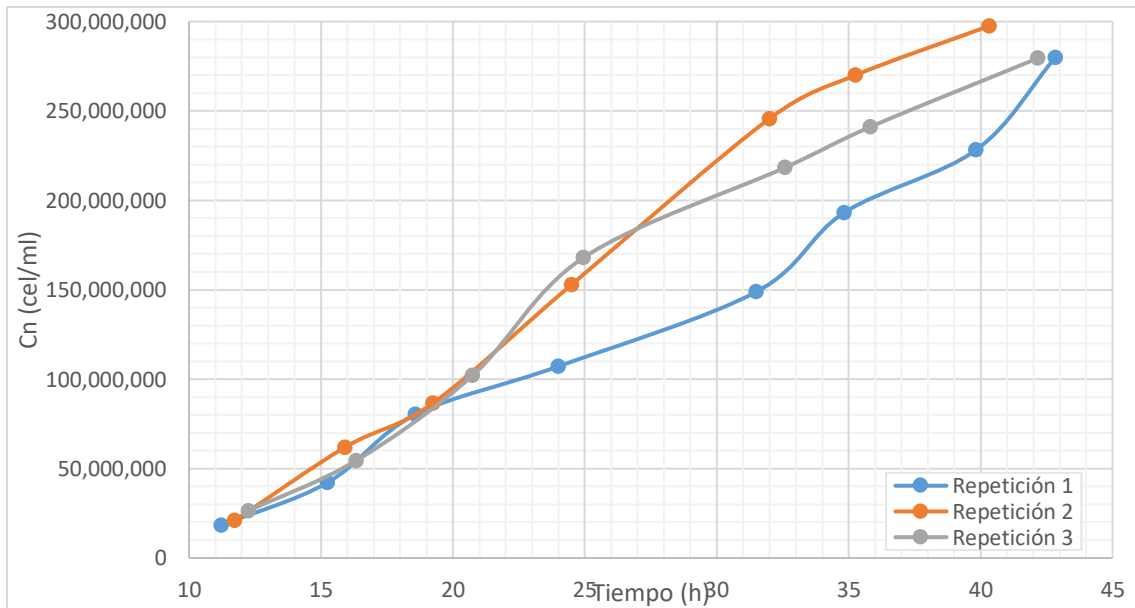


Figura 16. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSM con aireación.

4.1.2.1.1. Parámetros cinéticos.

Con base en la metodología utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación (ver 4.1.1.1.1.), se obtuvieron los siguientes resultados para los datos representados en la figura 16:

1) Velocidad específica de crecimiento (μ):

A continuación, se muestran los ajustes polinómicos de las curvas de $\ln(Cn)$ contra tiempo para las tres repeticiones, así como los valores promedio de μ para cada caso (ver tablas 13, 14 y 15).

Repetición 1:

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

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

t (h)	Cn (cel/ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
11.2333	18,375,000	0.2616	0.2260
15.2500	42,200,000	0.1904	
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	

Repetición 2:

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

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

t (h)	Cn (cel/ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
11.7333	21,030,000	0.2417	0.2030
15.9167	61,987,500	0.1643	
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	

Repetición 3:

$$y = 0.0001x^3 - 0.0115x^2 + 0.4629x + 12.9397 \quad R^2 = 0.9976$$

$$\mu = 0.0003x^2 - 0.023x + 0.4629$$

Tabla 15. $\bar{\mu}$ de <i>S. cerevisiae</i> en MMSM con aireación, R3.			
t (h)	C_n (cel / ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
12.2500	26,370,000	0.2262	0.1968
16.3333	54,487,500	0.1673	
20.7500	102,125,000	0.1148	
24.9500	168,000,000	0.0758	
32.5833	218,350,000	0.0320	
35.8333	241,200,000	0.0239	
42.1667	279,500,000	0.0265	

2) Velocidad de división promedio

Para las tres repeticiones se tiene que:

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

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

$$\delta_3 = \frac{\mu_3}{0.301} = \frac{0.1968 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.6538 \text{ h}^{-1}$$

3) Tiempo de duplicación (t_d):

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

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

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

$$t_{d,3} = \frac{1}{\delta_3} = \frac{1}{0.6538 \text{ h}^{-1}} = 1.5295 \text{ h}$$

4) Números de generaciones (n):

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

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

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

$$n_3 = \frac{\log_{10}(279,500,000) - \log_{10}(26,370,000)}{0.301} = 3.4062$$

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

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

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

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

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

6) Velocidad de crecimiento celular (r_n):

Los valores de r_n se obtienen mediante la ecuación: $r_n = \mu \cdot C_n$. Dicho esto, se determinaron las velocidades de crecimiento celular para cada uno de las repeticiones (ver tablas 16, 17 y 18).

t (h)	C_n (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

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

t (h)	C_n (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
12.2500	26,370,000	0.1968	5,189,616
16.3333	54,487,500		10,723,140
20.7500	102,125,000		20,098,200
24.9500	168,000,000		33,062,400
32.5833	218,350,000		42,971,280
35.8333	241,200,000		47,468,160
42.1667	279,500,000		55,005,600

4.1.2.2. Biorreactor.

En la figura 17, se muestra la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSB con aireación. Se observa en la curva de crecimiento las fases de latencia, exponencial, y de muerte.

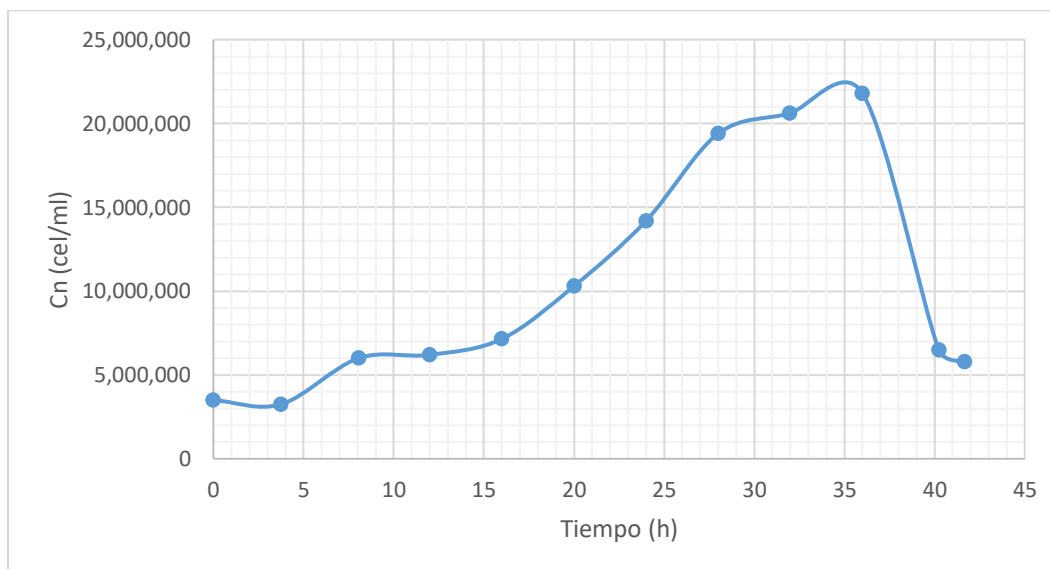


Figura 17. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en MMSB con aireación.

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 18 se muestra dicha fase correspondiente a la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* mostrada en la figura 17.

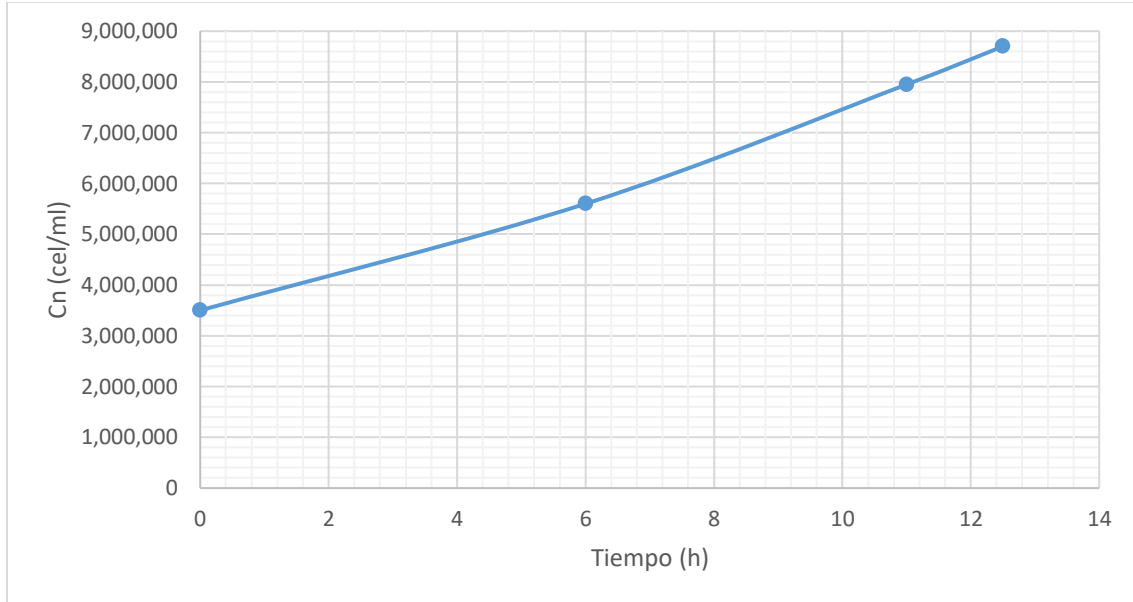


Figura 18. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSB con aireación.

4.1.2.2.1. Parámetros cinéticos.

A partir de los datos representados en la figura 18, se muestra a continuación la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en tal condición metabólica:

1) Velocidad específica de crecimiento (μ):

Para la determinación del valor de μ , se emplea la ecuación 13.

$$\underbrace{\ln(C_n)}_y = \underbrace{\mu}_{b_1} \cdot \underbrace{t}_x + \underbrace{\ln(C_{n_0})}_{b_0}. \quad (13)$$

Para dicha determinación de μ , es necesario graficar $\ln(C_n)$ contra tiempo, y realizar el ajuste lineal a la curva resultante. Este modelo sólo puede emplearse cuando los datos se ajustan al modelo lineal con una $R^2 \geq 0.95$. A continuación, en la figura 19 se muestra la gráfica de $\ln(C_n)$ contra tiempo, empleando los datos de la figura 18, así como su ajuste lineal.

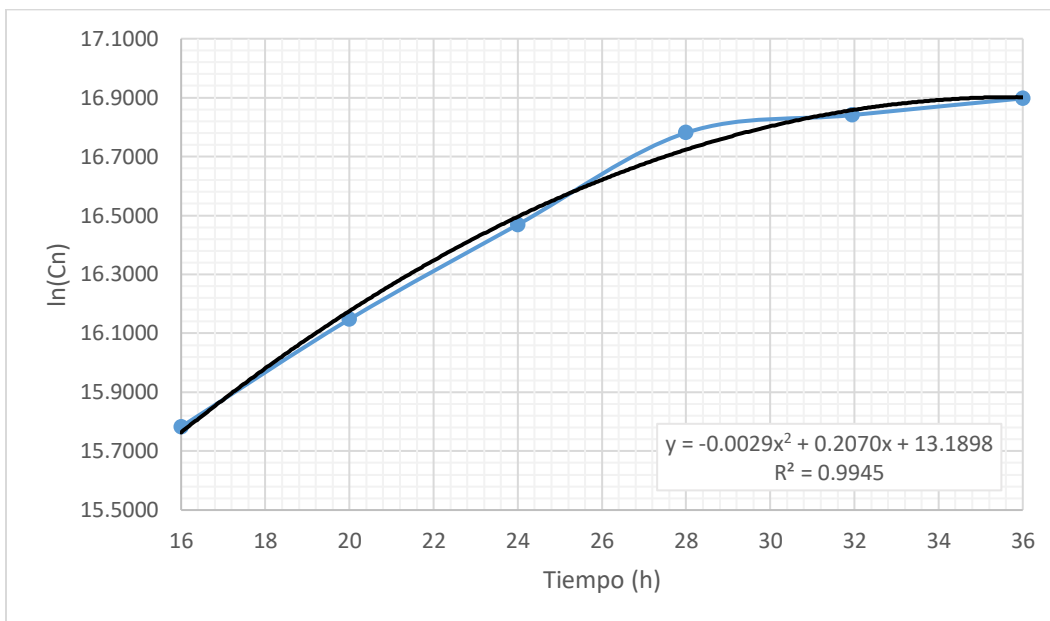


Figura 19. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MMSB con aireación (ln).

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 $\bar{\mu}$ (ver tabla 19).

$$y = -0.0029x^2 + 0.2070x + 13.1898 \quad R^2 = 0.9945$$

$$\mu = -0.0058t + 0.2070$$

Tabla 19. $\bar{\mu}$ de *S. cerevisiae* en MMSB con aireación.

t (h)	C_n (cel/ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
16.0000	7,150,000	0.1142	0.1026
20.0000	10,300,000	0.0910	
24.0000	14,200,000	0.0678	
28.0000	19,400,000	0.0446	
31.9500	20,600,000	0.0217	
36.0000	21,800,000	-0.0018	

2) Velocidad de división promedio (δ):

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

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

Sustituyendo μ en la ecuación anterior, se tiene que:

$$\delta = \frac{0.1026 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.3409 \text{ h}^{-1}.$$

3) Tiempo de duplicación (t_d):

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

Sustituyendo δ en la ecuación anterior, se tiene que:

$$t_d = \frac{1}{0.3409 \text{ h}^{-1}} = 2.9334 \text{ h}.$$

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:

$$n = \frac{\log_{10}(21,800,000) - \log_{10}(7,150,000)}{0.301} = 1.6085.$$

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

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

$$C_{n_{max}} = 21,800,000 \text{ cel/ml}.$$

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 este experimento (ver tabla 20).

Tabla 20. Valores de r_n para <i>S. cerevisiae</i> en MMSB con aireación.			
t (h)	C_n (cel / ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
16.0000	7,150,000	0.1026	733,590
20.0000	10,300,000		1,056,780
24.0000	14,200,000		1,456,920
28.0000	19,400,000		1,990,440
31.9500	20,600,000		2,113,560
36.0000	21,800,000		2,236,680

4.1.3. Resumen de los parámetros cinéticos.

En la tabla 21, se muestran de forma resumida los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales en matraces y en biorreactor, con y sin aireación.

Tabla 21. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MMS.										
Matraz (MMSM)										
R	Sin aireación					Con aireación				
	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)	μ (h^{-1})	δ (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	0.1968	0.6538	1.5295	3.4062	279,500,000
P	0.2159	0.7172	1.3945	3.7458	150,062,500	0.2086	0.6930	1.4481	3.7198	285,700,000
Biorreactor (MMSB)										
R	Sin aireación					Con aireación				
	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)
1	0.0731	0.2429	4.1169	1.3138	8,700,000	0.1026	0.3409	2.9334	1.6085	21,800,000

R=Repetición, P=Promedio, μ = Velocidad específica de crecimiento, δ = 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 melaza.

4.2.1. Matraces.

4.2.1.1. Sin aireación.

En la figura 20 se muestran los cultivos de *S. cerevisiae* en MCBMM y en condición anaerobia; la coloración de este medio de cultivo fue oscura debido al color característico de la melaza.



Figura 20. Cultivo de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación.

En la figura 21, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, obtenidas del experimento por triplicado. Se observa un comportamiento similar entre dichas curvas, lo cual indica que el crecimiento de este microorganismo es específico para esta condición metabólica.

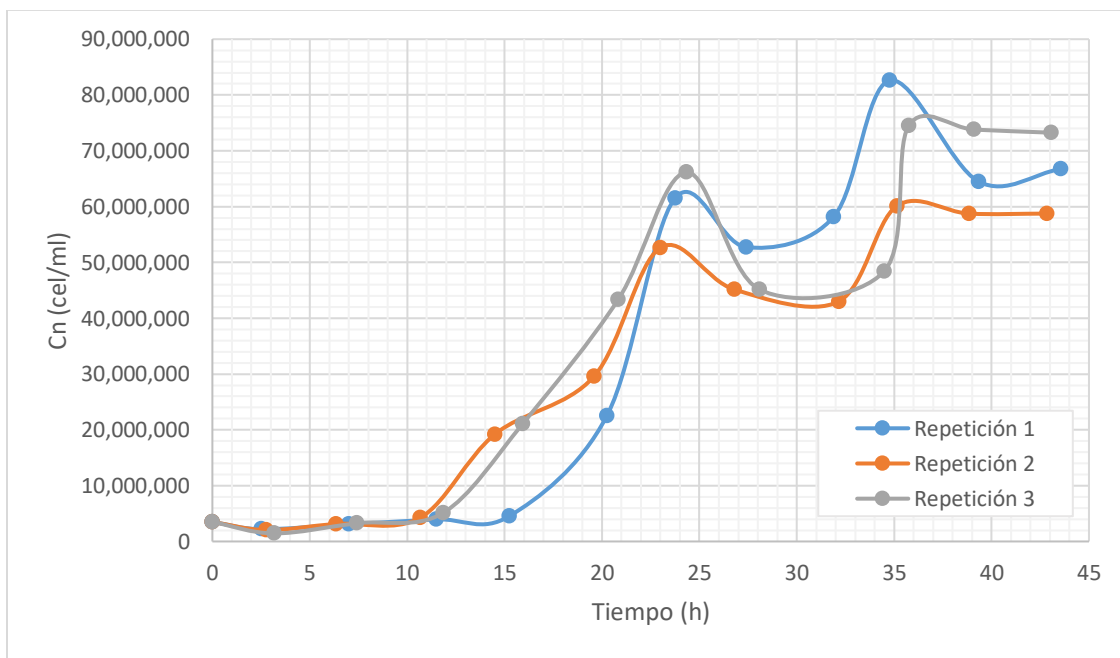


Figura 21. Curvas de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación.

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 22 se muestran dichas fases correspondientes a cada una de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 21.

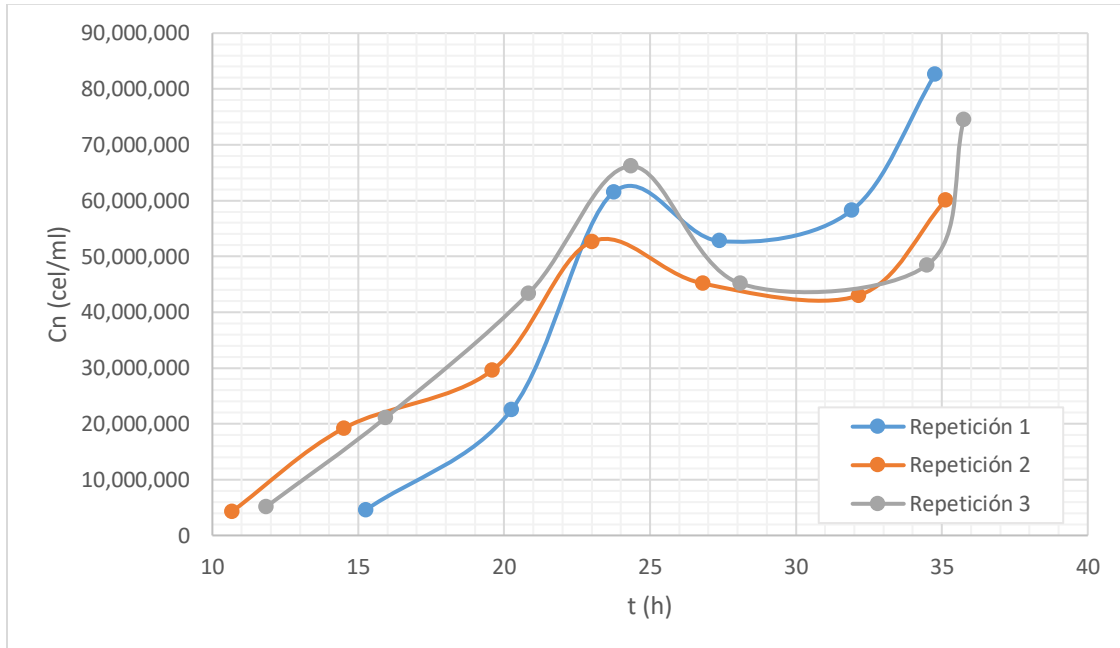


Figura 22. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación.

En la figura 22 se puede notar que las fases exponenciales no tienden al comportamiento lineal, dado que en la mitad de ellas existe una pequeña disminución de la concentración celular, misma que aumenta nuevamente después de aproximadamente 6 horas. A pesar de esto, estas curvas se consideraron como fases exponenciales, ya que el criterio de selección para dichas fases consiste en tomar como punto inicial al punto final de la fase de latencia y como punto final, la máxima concentración celular alcanzada (ver figura 3).

4.2.1.1.1. Parámetros cinéticos.

Con base en la metodología utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MMSM sin aireación (ver 4.1.1.1.1.), se obtuvieron los siguientes resultados para los datos representados en la figura 22.

1) Velocidad específica de crecimiento (μ):

A continuación, se muestran los ajustes polinómicos de las curvas de $\ln(Cn)$ contra tiempo para las tres repeticiones, así como los valores promedio de μ para cada caso (ver tablas 22, 23 y 24).

Repetición 1:

$$y = 0.0009x^3 - 0.0818x^2 + 2.3737x - 5.2362 \quad R^2 = 0.9778$$

$$\mu = 0.0027t^2 - 0.1636t + 2.3737$$

Tabla 22. $\bar{\mu}$ de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, R1.

t (h)	Cn (cel / ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
15.2500	4,550,000	0.5067	0.3374
20.2500	22,500,000	0.1680	
23.7500	61,500,000	0.0112	
27.3833	52,750,000	-0.0816	
31.9000	58,200,000	-0.0976	
34.7667	82,600,000	-0.0506	

Repetición 2:

$$y = 0.0006x^3 - 0.0477x^2 + 1.2632x + 6.5264 \quad R^2 = 0.9765$$

$$\mu = 0.0018t^2 - 0.0954t + 1.2632$$

Tabla 23. $\bar{\mu}$ de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, R2.

t (h)	Cn (cel / ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
10.6667	4,250,000	0.4504	0.3544
14.5000	19,200,000	0.2584	
19.5833	29,550,000	0.0853	
23.0000	52,650,000	0.0212	
26.8000	45,150,000	-0.0007	
32.1500	43,000,000	0.0566	
35.1333	60,100,000	0.1333	

Repetición 3:

$$y = 0.0007x^3 - 0.0594x^2 + 1.5950x + 3.6425 \quad R^2 = 0.9774$$

$$\mu = 0.0021t^2 - 0.1188t + 1.5950$$

Tabla 24. $\bar{\mu}$ de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, R3.

t (h)	Cn (cel / ml)	μ (h^{-1})	$\bar{\mu}$ (h^{-1})
11.8333	5,100,000	0.4833	0.3593
15.9333	21,100,000	0.2353	
20.8333	43,350,000	0.0315	
24.3333	66,150,000	-0.0524	
28.0833	45,150,000	-0.0851	
34.4833	48,400,000	-0.0045	
35.7500	74,500,000	0.0318	

2) Velocidad de división promedio (δ):

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

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

$$\delta_1 = \frac{0.3593 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 1.1937 \text{ h}^{-1}$$

$$\delta_2 = \frac{0.3374 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 1.1209 \text{ h}^{-1}$$

$$\delta_3 = \frac{0.3544 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 1.1774 \text{ h}^{-1}$$

3) Tiempo de duplicación (t_d):

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

$$t_{d,1} = \frac{1}{1.1937 \text{ h}^{-1}} = 0.8377 \text{ h}$$

$$t_{d,2} = \frac{1}{1.1209 \text{ h}^{-1}} = 0.8921 \text{ h}$$

$$t_{d,3} = \frac{1}{1.1774 \text{ h}^{-1}} = 0.8493 \text{ h}$$

4) Números de generaciones (n):

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

$$n_1 = \frac{\log_{10}(82,600,000) - \log_{10}(4,550,000)}{0.301} = 4.1826$$

$$n_2 = \frac{\log_{10}(60,100,000) - \log_{10}(4,250,000)}{0.301} = 3.8222$$

$$n_3 = \frac{\log_{10}(74,500,000) - \log_{10}(5,100,000)}{0.301} = 3.8690$$

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

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

$$Cn_{\max,1} = 82,600,000 \text{ cel/ml}$$

$$Cn_{\max,2} = 60,100,000 \text{ cel/ml}$$

$$Cn_{\max,3} = 74,500,000 \text{ cel/ml}$$

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 las repeticiones (ver tablas 25, 26 y 27).

Tabla 25. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, R1.

t (h)	Cn (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
15.2500	4,550,000	0.3374	1,535,170
20.2500	22,500,000		7,591,500
23.7500	61,500,000		20,750,100
27.3833	52,750,000		17,797,850
31.9000	58,200,000		19,636,680
34.7667	82,600,000		27,869,240

Tabla 26. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, R2.

t (h)	Cn (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
10.6667	4,250,000	0.3544	1,506,200
14.5000	19,200,000		6,804,480
19.5833	29,550,000		10,472,520
23.0000	52,650,000		18,659,160
26.8000	45,150,000		16,001,160
32.1500	43,000,000		15,239,200
35.1333	60,100,000		21,299,440

Tabla 27. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación, R3.

t (h)	Cn (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
11.8333	5,100,000	0.3593	1,832,430
15.9333	21,100,000		7,581,230
20.8333	43,350,000		15,575,655
24.3333	66,150,000		23,767,695
28.0833	45,150,000		16,222,395
34.4833	48,400,000		17,390,120
35.7500	74,500,000		26,767,850

4.2.1.2. Con aireación.

En la figura 23a se muestra el matraz para aireación del medio de cultivo a base de melaza en matraz (MCBMM); para la esterilización de estos medios de cultivo en la autoclave, se introdujeron los matraces con tapón de algodón y con la manguera de hule doblada en sus extremos, para evitar que el medio de cultivo escapara durante la esterilización (debido a la evaporación del agua contenida); en la figura 23b se muestran los matraces con MCBM inoculados con *S. cerevisiae* en condición aerobia y en agitación.



(a)



(b)

Figura 23. Medio de cultivo a base de melaza en matraz con aireación.

En la figura 24, se muestran las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en MCBMM con aireación, obtenidas del experimento por triplicado. Se observa un comportamiento similar entre dichas curvas, lo cual indica que el crecimiento de este microorganismo es específico para esta condición metabólica.

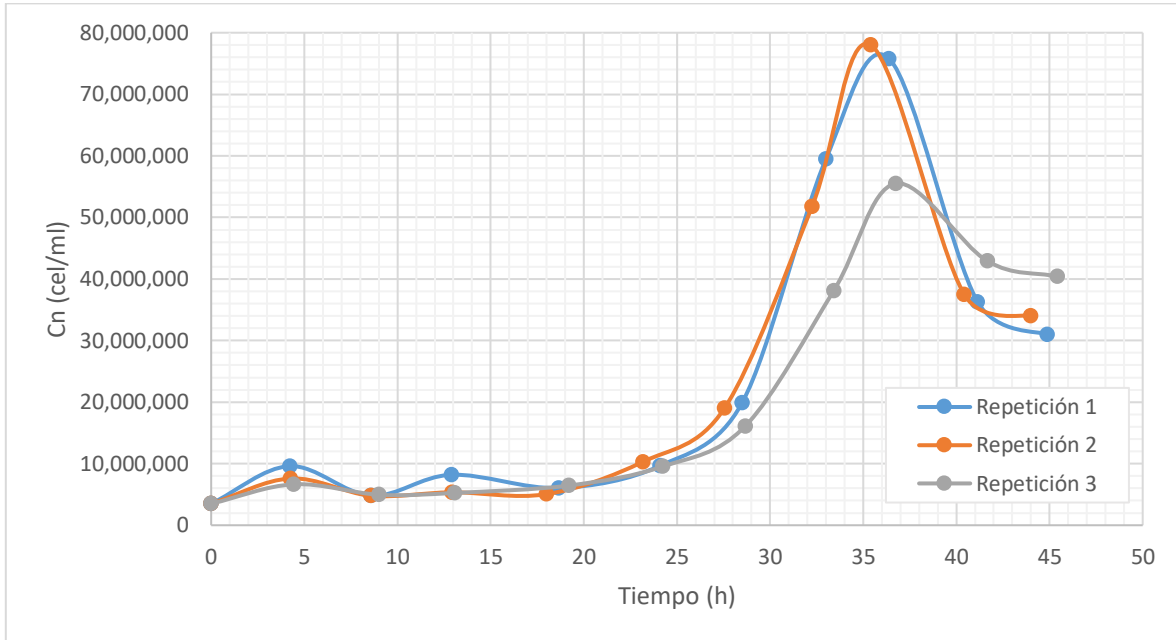


Figura 24. Curvas de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en MCBMM con aireación.

Considerando el comportamiento característico de la fase exponencial de un microorganismo (ver figura 3), en la figura 25 se muestran dichas fases correspondientes a cada una de las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* mostradas en la figura 24.

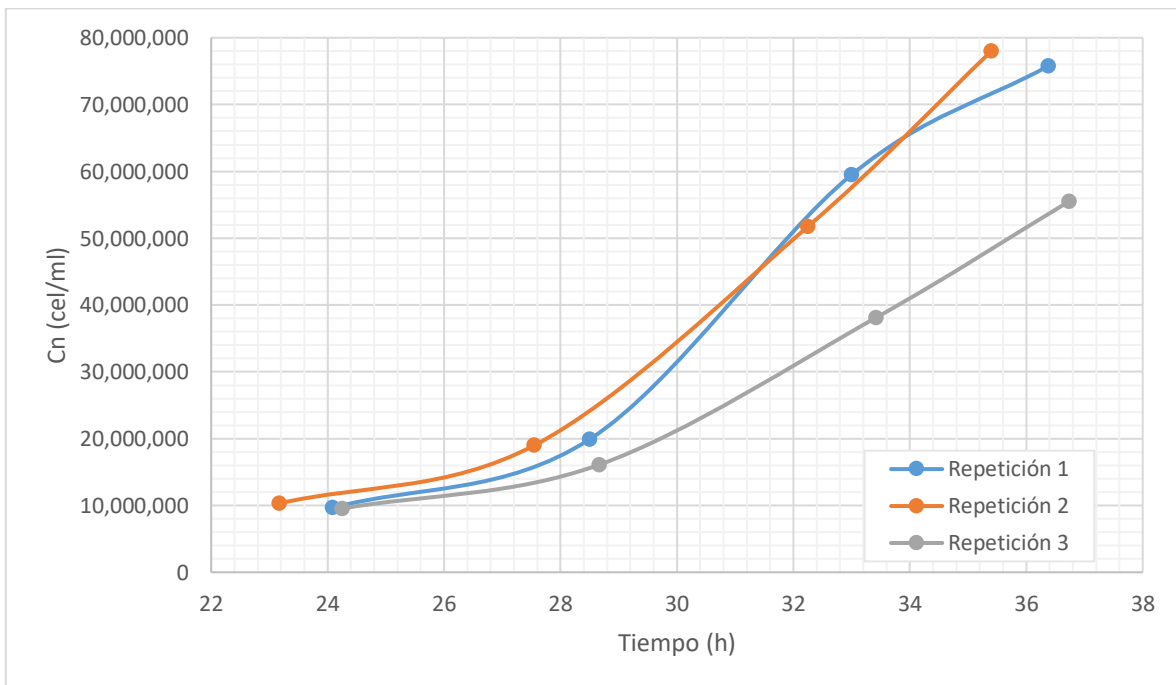


Figura 25. Fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBMM con aireación.

4.2.1.2.1. Parámetros cinéticos.

A partir de los puntos de las curvas presentadas en la figura 25 y considerando la metodología utilizada para la determinación de los parámetros de *S. cerevisiae* en MMSB sin aireación (ver 4.1.1.2.1), se calculan los parámetros cinéticos para MCBMM con aireación.

1) Velocidad específica de crecimiento (μ):

Repetición 1:

$$\ln(C_n) = \underbrace{0.1774t}_{\mu} + \underbrace{11.8236}_{\ln(C_{n_0})} \quad R^2 = 0.9735,$$

donde μ se obtiene directamente de la ecuación anterior, siendo este valor:

$$\mu_1 = 0.1774 \text{ h}^{-1}.$$

Repetición 2:

$$\ln(C_n) = \underbrace{0.1716t}_{\mu} + \underbrace{12.1326}_{\ln(C_{n_0})} \quad R^2 = 0.9914,$$

donde μ se obtiene directamente de la ecuación anterior, siendo este valor:

$$\mu_2 = 0.1716 \text{ h}^{-1}.$$

Repetición 3:

$$\ln(C_n) = \underbrace{0.1460t}_{\mu} + \underbrace{12.4954}_{\ln(C_{n_0})} \quad R^2 = 0.9916,$$

donde μ se obtiene directamente de la ecuación anterior, siendo este valor:

$$\mu_3 = 0.1460 \text{ h}^{-1}.$$

2) Velocidad de división promedio (δ):

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

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

$$\delta_1 = \frac{0.1774 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.5893 \text{ h}^{-1}$$

$$\delta_2 = \frac{0.1716 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.5700 \text{ h}^{-1}$$

$$\delta_3 = \frac{0.1460 \text{ h}^{-1}}{0.301} = 0.4850 \text{ h}^{-1}$$

3) Tiempo de duplicación (t_d):

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

$$t_{d,1} = \frac{1}{0.5893 \text{ h}^{-1}} = 1.6969 \text{ h}$$

$$t_{d,2} = \frac{1}{0.5700 \text{ h}^{-1}} = 1.7543 \text{ h}$$

$$t_{d,3} = \frac{1}{0.4850 \text{ h}^{-1}} = 2.0618 \text{ h}$$

4) Números de generaciones (n):

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

Para las tres repeticiones se tiene que:

$$n_1 = \frac{\log_{10}(75,800,000) - \log_{10}(9,650,000)}{0.301} = 2.9739$$

$$n_2 = \frac{\log_{10}(78,000,000) - \log_{10}(10,300,000)}{0.301} = 2.9211$$

$$n_3 = \frac{\log_{10}(55,500,000) - \log_{10}(9,550,000)}{0.301} = 2.5392$$

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 repetición fue:

$$C_{n_{max,1}} = 75,800,000 \text{ cel/ml}$$

$$C_{n_{max,2}} = 78,000,000 \text{ cel/ml}$$

$$C_{n_{max,3}} = 55,500,000 \text{ cel/ml}$$

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 las repeticiones (ver tablas 28, 29 y 30).

Tabla 28. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MCBMM con aireación, R1.

t (h)	Cn (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
24.0833	9,650,000	0.1774	1,711,910
28.5000	19,900,000		3,530,260
33.0000	59,500,000		10,555,300
36.3833	75,800,000		13,446,920

Tabla 29. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MCBMM con aireación, R2.

t (h)	Cn (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
23.1667	10,300,000	0.1716	1,767,480
27.5500	19,000,000		3,260,400
32.2500	51,750,000		8,880,300
35.4000	78,000,000		13,384,800

Tabla 30. Valores de r_n para *S. cerevisiae* en MCBMM con aireación, R3.

t (h)	Cn (cel/ml)	$\bar{\mu}$ (h^{-1})	r_n (cel/ml·h)
24.2500	9,550,000	0.1460	1,394,300
28.6667	16,100,000		2,350,600
33.4167	38,100,000		5,562,600
36.7333	55,500,000		8,103,000

4.2.2. Resumen de los parámetros cinéticos.

En la tabla 31, se muestran de forma resumida los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en medio de cultivo a base de melaza en matraces (MCBMM), con y sin aireación.

Tabla 31. Resumen de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> en MCBMM.										
R	Sin aireación					Con aireación				
	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)
1	0.3374	1.1937	0.8377	4.1826	82,600,000	0.1774	0.5893	1.6969	2.9739	75,800,000
2	0.3544	1.1209	0.8921	3.8222	60,100,000	0.1716	0.5700	1.7543	2.9211	78,000,000
3	0.3593	1.1774	0.8493	3.8690	74,500,000	0.1460	0.4850	2.0618	2.5392	55,500,000
P	0.3504	1.1640	0.8597	3.9579	72,400,000	0.1650	0.5481	1.8377	2.8114	69,766,667

R=Repetición, P=Promedio, μ = Velocidad específica de crecimiento, δ = Velocidad de división promedio, t_d = Tiempo de duplicación, n = Número de generaciones, Cn_{max} = Concentración celular máxima.

4.3. Evaluación de los parámetros cinéticos.

Una vez determinados los parámetros cinéticos promedio de *S. cerevisiae* en las condiciones anteriores, éstos se presentan de forma resumida en la tabla 32.

Tabla 32. Resumen de los parámetros cinéticos promedio de <i>S. cerevisiae</i> en los medios de cultivo.										
Medio de cultivo	Sin aireación					Con aireación				
	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)	μ (h^{-1})	δ (h^{-1})	t_d (h)	n	Cn_{max} (cel/ml)
MMSM	0.2159	0.7172	1.3945	3.7458	150,062,500	0.2086	0.6930	1.4481	3.7198	285,700,000
MCBMM	0.3504	1.1640	0.8597	3.9579	72,400,000	0.1650	0.5481	1.8377	2.8114	69,766,667
MMSB	0.0731	0.2429	4.1169	1.3138	8,700,000	0.1026	0.3409	2.9334	1.6085	21,800,000

MMSM=Medio Mínimo de Sales en Matraces, MCBMM=Medio de Cultivo a Base de Melaza en Matraces, MMSB= Medio Mínimo de Sales en Biorreactor. μ = Velocidad específica de crecimiento, δ = Velocidad de división promedio, n = Número de generaciones, t_d = Tiempo de duplicación, Cn_{max} = Concentración celular máxima.

Se procede a la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae*, considerando:

- El suministro de aire en los tres medios de cultivo (MMSM, MCBMM y MMSB), tomando como referencia su condición anaerobia (sin aireación),
- La condición anaerobia de MCBMM y MMSB, tomando como referencia a MMSM, y
- La condición aerobia de MCBMM y MMSB, tomando como referencia a MMSM.

Para facilitar dicho análisis, se determina la eficiencia del crecimiento celular mediante los parámetros cinéticos para cada uno de los escenarios anteriores, representándose de forma porcentual.

Determinación de la eficiencia para los parámetros cinéticos:

Para determinar la eficiencia de una variable (V), es necesario contar con el valor a comparar (V_C) y con el valor de referencia (V_R); dicho esto, se emplea la ecuación 16 para la determinación del porcentaje de error ($\%E$):

$$\%E = \frac{V_C - V_R}{V_R} \times 100\%. \quad (16)$$

Esta ecuación puede emplearse con dicho fin, pues la diferencia que existe entre ambos valores (error porcentual) puede ser considerado como el porcentaje de eficiencia, dado que, de la misma forma, indica la diferencia entre ambos valores. Un valor positivo de $\%E$ indica eficiencia, un valor negativo indica deficiencia.

Para poder emplear la ecuación 16 en la determinación de la eficiencia de los parámetros cinéticos, se consideran dos escenarios: el aumento y la disminución de V_C respecto a V_R .

- Con base en el aumento de sus valores.

La eficiencia para los parámetros cinéticos μ , δ , n y Cn_{\max} (Parámetros cinéticos a comparar P_C), se basa en el aumento de sus valores en comparación con los de referencia (P_R). Puesto que para:

μ : Un valor mayor de esta constante indica mayor velocidad específica de crecimiento; indirectamente, en conjunto con la concentración celular (Cn)

reflejan la velocidad de crecimiento celular (r_n) mediante la ecuación

$$r_n = \mu \cdot Cn. \text{ Si el valor de } \mu \text{ es grande, también lo será para } r_n.$$

δ : Un valor mayor indica un aumento en las generaciones que se producen por unidad de tiempo.

n : Un valor mayor indica un aumento en el número de generaciones.

Cn_{\max} : Un valor mayor indica un aumento en la concentración celular.

Con base en el análisis anterior, se tiene que el valor de los parámetros cinéticos a comparar (P_C) deben ser mayores a los parámetros cinéticos de referencia (P_R), pues la diferencia entre ambos dará un valor positivo, es decir, existirá eficiencia ($+\%E$); dicho análisis se representa con la siguiente expresión:

$$P_C > P_R : +\% E .$$

A partir de la expresión anterior, la ecuación 16 se modifica de la siguiente manera (ver ecuación 17), pues existe eficiencia cuando $P_C > P_R$, o bien, cuando la diferencia entre P_C y P_R da como resultado un valor positivo.

$$\% E_A = \frac{P_C - P_R}{P_R} \times 100\% . \quad (17)$$

Donde:

- $\% E_A$ = Eficiencia en el parámetro cinético con base en el aumento de P_C , %.
Un valor positivo indica eficiencia en el parámetro cinético de la condición metabólica estudiada, un valor negativo indica deficiencia.
- P_C = Valor del parámetro cinético a comparar.
- P_R = Valor del parámetro cinético de referencia (control).
- 100% = Múltiplo de porcentaje.

- Con base en la disminución de sus valores.

Para el caso del parámetro cinético t_d , la eficiencia se basa en la disminución de su valor, ya que un valor bajo indica que la célula se divide en menor tiempo, lo cual es favorable. Esto puede resumirse a que el valor de este parámetros cinéticos a comparar (P_C) deben ser mayor al del parámetro cinético de referencia (P_R), y que la diferencia entre ambos dará un valor positivo, es decir, existirá eficiencia ($+\% E$).

$$P_C < P_R : +\% E$$

$$P_R > P_C : +\% E .$$

Con base en el análisis anterior, la ecuación 16 se modifica de la siguiente manera (ver ecuación 18), pues existe eficiencia cuando $P_R > P_C$, o bien, cuando la diferencia entre P_R y P_C da como resultado un valor positivo.

$$\% E = \frac{V_R - V_C}{V_R} \times 100\% . \quad (18)$$

Dicho esto, y con base en la ecuación 18, se emplea la ecuación 19 para determinar la eficiencia del parámetro cinético mencionado:

$$\% E_D = \frac{P_R - P_C}{P_R} \times 100\%. \quad (19)$$

Donde:

$\% E_D$ = Eficiencia en el parámetro cinético con base en la disminución de P_C , %.

Un valor positivo indica eficiencia en el parámetro cinético de la condición metabólica estudiada, un valor negativo indica deficiencia.

P_C = Valor del parámetro cinético a comparar.

P_R = Valor del parámetro cinético de referencia (control).

100% = Múltiplo de porcentaje.

4.3.1. Suministro de aire en los medios de cultivo.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* considerando el suministro de aire en MMSM, MCBMM y MMSB, se tomaron como referencia a los parámetros cinéticos correspondientes a la condición anaerobia para cada medio de cultivo. En la tabla 33 se muestra la evaluación de dichos parámetros cinéticos, representándose en porcentaje de eficiencia; dichos resultados se obtuvieron al emplear las ecuaciones 17 y 19.

Tabla 33. Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> con base en el suministro de aire.						
Parámetro Cinético	μ (h^{-1})			δ (h^{-1})		
Condición	Sin aire (Control)	Con aire	%Eficiencia	Sin aire (Control)	Con aire	%Eficiencia
MMSM	0.2159	0.2086	-3.3812	0.7172	0.6930	-3.3742
MCBMM	0.3504	0.1650	-52.9110	1.1640	0.5481	-52.9124
MMSB	0.0731	0.1026	40.3557	0.2429	0.3409	40.3458
Parámetro Cinético	t_d (h)			n		
Condición	Sin aire (Control)	Con aire	%Eficiencia	Sin aire (Control)	Con aire	%Eficiencia
MMSM	1.3945	1.4481	-3.8437	3.7458	3.7198	-0.6941
MCBMM	0.8597	1.8377	-113.7606	3.9579	2.8114	-28.9674
MMSB	4.1169	2.9334	28.7474	1.3138	1.6085	22.4311
Parámetro Cinético	Cn_{max} (cel/ml)					
Condición	Sin aire (Control)	Con aire		%Eficiencia		
MMSM	150,062,500	285,700,000		90.3873		
MCBMM	72,400,000	69,766,667		-3.6372		
MMSB	8,700,000	21,800,000		150.5747		
MMSM=Medio Mínimo de Sales en Matracas, MCBM=Medio de Cultivo a Base de Melaza, MMSB= Medio Mínimo de Sales en Biorreactor. μ =Velocidad específica de crecimiento, δ =Velocidad de división promedio, n =Número de generaciones, t_d =Tiempo de duplicación, Cn_{max} = Concentración celular máxima.						

Con base en los datos de la tabla 33, se discuten los resultados de la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en los medios de cultivo estudiados. Analizando los parámetros cinéticos del microorganismo en MMSM con aireación, en comparación con los parámetros de la condición anaerobia, se observa que el parámetro Cn_{max} se ve favorecido con 90.39% de eficiencia. Sin embargo, los parámetros cinéticos μ , δ , t_d y n se ven desfavorecidos, con valores de deficiencia menores a 4%; esto indica que a pesar de obtener mayor Cn_{max} , el desarrollo del microorganismo es desfavorable (más lento) en comparación de la condición anaerobia.

En el caso del MCBMM, la adición de aire desfavorece a todos los parámetros cinéticos. Esto indica que el desarrollo de *S. cerevisiae* es mejor en condición anaerobia, pues en condición aerobia se desarrolla más lento y se obtiene menor concentración celular.

Finalmente, en el MMSB se observa que la aireación favorece a todos los parámetros cinéticos; es decir, el desarrollo de *S. cerevisiae* en condición aerobia es mejor que en condición anaerobia.

4.3.2. Condición anaerobia.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MCBMM y MMSB sin aireación, se tomaron como referencia los parámetros correspondientes al MMSM; para ello, se emplearon las ecuaciones 17 y 19 para determinar la eficiencia de dichos parámetros (ver tabla 34).

Tabla 34. Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> con base en la condición anaerobia.					
Parámetro Cinético	MMSM (Control)	MCBMM	%Eficiencia	MMSB	%Eficiencia
μ (h^{-1})	0.2159	0.3504	62.2974	0.0731	-66.1417
δ (h^{-1})	0.7172	1.1640	62.2978	0.2429	-66.1322
t_d (h)	1.3945	0.8597	38.3507	4.1169	-195.2241
n	3.7458	3.9579	5.6623	1.3138	-64.9261
Cn_{max} (cel/ml)	150,062,000	72,400,000	-51.7533	8,700,000	-94.2024

MMSM=Medio Mínimo de Sales en Matracas, MCBMM=Medio de Cultivo a Base de Melaza, MMSB= Medio Mínimo de Sales en Biorreactor. μ = Velocidad específica de crecimiento, δ = Velocidad de división promedio, n = Número de generaciones, t_d = Tiempo de duplicación, Cn_{max} = Concentración celular máxima.

Analizando los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MCBMM, en comparación con MMSM, se aprecia que el desarrollo del microorganismo se ve favorecido, pues la eficiencia en los parámetros cinéticos μ , δ , t_d y n es mayor; sin embargo, la Cn_{max} obtenida es menor que en MMSM. Esto quiere decir que a pesar que el microorganismo se desarrolla más rápido en MCBMM, no genera mayor concentración celular que en MMSM.

En el caso de MMSB, todos los parámetros cinéticos presentan deficiencia; es decir, *S. cerevisiae* se desarrolla mejor en matracas que en el biorreactor, pues en este último, el microorganismo se desarrolla más lento y genera menos concentración celular que en MMSM.

4.3.3. Condición aerobia.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MCBMM y MMSB con aireación, se tomaron como referencia los parámetros correspondientes al MMSM; para ello, se emplearon las ecuaciones 17 y 19 para determinar la eficiencia de dichos parámetros (ver tabla 35).

Tabla 35. Evaluación de los parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> con base en la condición aerobia.					
Parámetro Cinético	MMSM (Control)	MCBMM	%Eficiencia	MMSB	%Eficiencia
μ (h^{-1})	0.2086	0.1650	-20.9012	0.1026	-50.8150
δ (h^{-1})	0.6930	0.5481	-20.9091	0.3409	-50.8081
t_d (h)	1.4481	1.8377	-26.9042	2.9334	-102.5689
n	3.7198	2.8114	-24.4207	1.6085	-56.7584
Cn_{max} (cel/ml)	285,700,000	69,766,667	-75.5804	21,800,000	-92.3696
MMSM=Medio Mínimo de Sales en Matracas, MCBMM=Medio de Cultivo a Base de Melaza, MMSB= Medio Mínimo de Sales en Biorreactor. μ = Velocidad específica de crecimiento, δ = Velocidad de división promedio, n = Número de generaciones, t_d = Tiempo de duplicación, Cn_{max} = Concentración celular máxima.					

Analizando los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en MCBMM, en comparación con MMSM, se aprecia que el desarrollo del microorganismo se ve desfavorecido, pues todos los parámetros cinéticos presentan deficiencia, es decir, en MCBMM el microorganismo se desarrolla más lento y genera menor concentración celular que en MMSM.

Del mismo modo, en MMSB todos los parámetros cinéticos presentan deficiencia; es decir, *S. cerevisiae* se desarrolla mejor en MMSM que en MMSB, pues en este último, el microorganismo se desarrolla más lento y genera menor concentración celular.

4.4. Análisis estadístico.

Con base en los resultados presentados en la tabla 32 y considerando el planteamiento de la tabla 5, en la tabla 36 se muestran los valores promedio de las velocidades específicas de crecimiento celular (μ) obtenidas en cada uno de los seis tratamientos, pues dicho parámetro cinético es en este caso, la variable de estudio (variable de respuesta).

Medio de cultivo	Aireación (L/min)			
	0		2.4	
Medio Mínimo de Sales en Matraz (MMSM)	T1	0.2160	T2	0.2260
		0.2181		0.2030
		0.2135		0.1968
Medio de Cultivo a Base de Melaza en Matraz (MCBMM)	T3	0.3374	T4	0.1774
		0.3544		0.1716
		0.3593		0.1460

4.4.1. Análisis de varianza (ANOVA) de dos factores.

1) Planteamiento de hipótesis.

- Medio de cultivo (Factor 1):
 - H_0 : No existe efecto significativo del medio de cultivo sobre μ .
 - H_1 : Existe efecto significativo del medio de cultivo sobre μ .
- Aireación (Factor 2):
 - H_0 : No existe efecto significativo de la aireación sobre μ .
 - H_1 : Existe efecto significativo de la aireación sobre μ .
- Interacción de ambos factores:
 - H_0 : No existe interacción del medio de cultivo y la aireación sobre μ .
 - H_1 : Existe interacción del medio de cultivo y la aireación sobre μ .

Donde:

H_0 : Hipótesis nula.

H_1 : Hipótesis alternativa.

2) Selección del nivel de significancia (α).

El nivel de significancia (α) es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es verdadera. Dicho valor indica el porcentaje de riesgo de concluir que existe una diferencia cuando realmente no la hay (porcentaje de error aceptable).

Se escogió utilizar un valor de $\alpha=0.05$.

3) Prueba ANOVA de dos factores.

ANOVA de dos factores: U (Y) vs. Medio de cultivo (X1), Aireación (X2)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Medio de cultivo (X1)	1	0.0061971	0.0061971	37.95	0.000
Aireación (X2)	1	0.0278307	0.0278307	170.41	0.000
Interacción	1	0.0237897	0.0237897	145.67	0.000
Error	8	0.0013065	0.0001633		
Total	11	0.0591240			

S = 0.01278

R-cuad. = 97.79%

Los factores "Medio de cultivo" y "Aireación", explican el 97.79% de la variación de la "Velocidad específica de crecimiento celular (u)".

En el anexo 5 se muestra el análisis estadístico completo.

4) Conclusión (regla de decisión).

La decisión de aprobar la hipótesis se basa en el valor de p (probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula): si el valor de p es menor al de α , entonces la hipótesis nula es rechazada. Cuanto menor sea p , más significativo será el resultado (efecto del factor dependiente en la variable dependiente). Si $p < \alpha$, se rechaza H_0 .

- Medio de cultivo (Factor 1):

$\alpha = 0.05$.

$p = 0.000$.

Como $p < \alpha$, se rechaza H_0 y se concluye que existe efecto significativo del medio de cultivo sobre μ .

- Aireación (Factor 2):

$\alpha = 0.05$.

$p = 0.000$.

Como $p < \alpha$, se rechaza H_0 y se concluye que existe efecto significativo de la aireación sobre μ .

- Interacción de ambos factores:

$\alpha = 0.05$.

$p = 0.000$.

Como $p < \alpha$, se rechaza H_0 y se concluye que existe interacción del medio de cultivo y la aireación sobre μ .

5) Interpretación de resultados clave para gráfica de probabilidad.

La gráfica de probabilidad normal de residuos permite verificar el supuesto de que los residuos están distribuidos normalmente; dicha gráfica debe de seguir aproximadamente una línea recta. Cuando los residuos no tienen distribución normal, se pueden presentar algunos patrones, mismos que tienen diferente significado:

- Una línea no recta: Indica la anormalidad de datos (mala distribución de datos).
- Un punto que está alejado de la línea: Indica un valor atípico.
- Una pendiente cambiante: Indica una variable no identificada.

Como puede observarse en la figura 26, los datos se distribuyen a lo largo de una línea recta, no se tienen puntos alejados al ajuste lineal ni presentan pendiente cambiante. Esto significa que los residuos presentan una distribución normal y que los resultados de las pruebas son fiables.

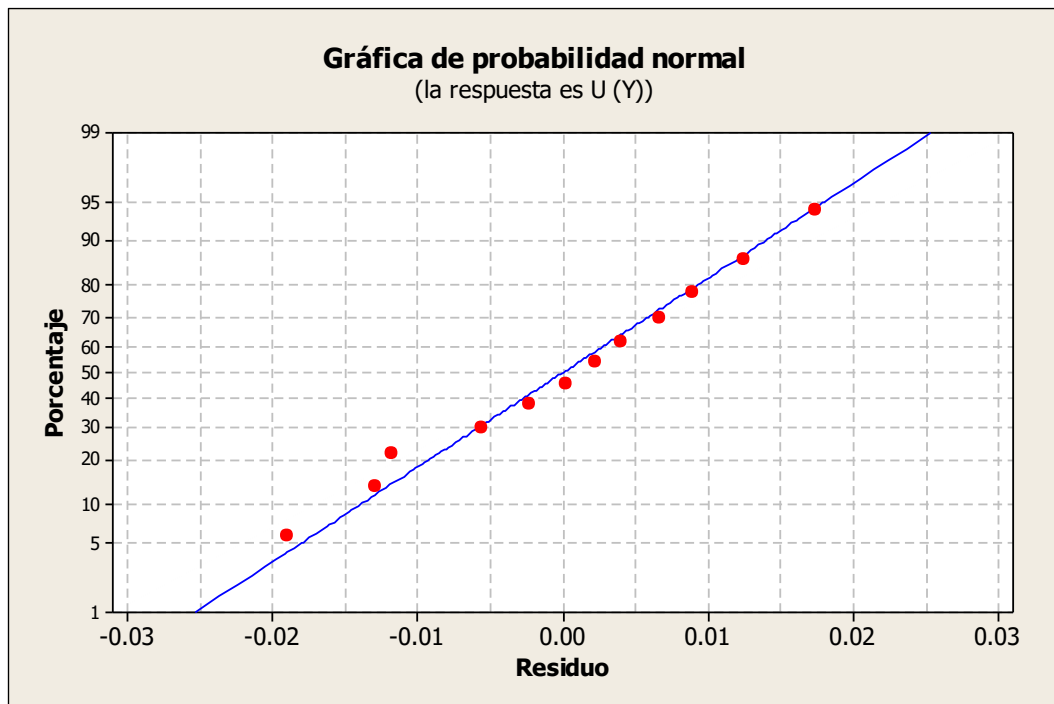


Figura 26. Gráfica de probabilidad normal del experimento.

CAPÍTULO V – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* (ver tablas 33, 34 y 35) en medios de cultivo a base de melaza en matraces (MCBMM) medio mínimo de sales en matraces (MMSM) y en biorreactor (MMSB), con y sin aireación, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Con base en el análisis de varianza de dos factores realizado a los valores de velocidad específica de crecimiento celular (μ) de *S. cerevisiae*, se concluye que el tipo de medio de cultivo, las formas de aireación y la interacción de ambos factores, causan efectos significativos en μ . Esto significa que la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve afectado al variar las condiciones de cultivo, tales como el tipo de medio de cultivo y el suministro o ausencia de aire.
- Los parámetros cinéticos μ , δ y t_d reflejan la velocidad a la que se desarrolla el microorganismo; sin embargo, valores favorables de dichos parámetros no siempre indican eficiencia en la cantidad máxima de concentración celular producida (biomasa).
- El suministro de aire en los cultivos de *S. cerevisiae* en medio mínimo de sales tanto en matraces como en biorreactor, favorece la obtención de una mayor concentración celular (Cn_{max}) en comparación con la condición anaerobia; esto debido a que mediante la respiración, la oxidación de los azúcares es completa y se obtiene mayor energía en comparación que en el estado anaerobio, ya que en este último caso la oxidación de dicho nutriente es incompleta y se producen productos más complejos.
- En MMSB con aireación, *S. cerevisiae* presentó mayor Cn_{max} y eficiencia en todos sus parámetros cinéticos, lo cual indica que éste se desarrolla más rápido que sin aireación. En el caso de MMSM con aireación también se obtuvo mayor Cn_{max} que en condición anaerobia, sin embargo, se presentó una deficiencia menor a 4% en los parámetros cinéticos μ , δ , t_d y n ; esto indica que el microorganismo se reproduce más rápido en el biorreactor que en matraces, empleando el medio mínimo de sales.
- *S. cerevisiae* es capaz de desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno; con base en la literatura, los microorganismos aerobios facultativos se desarrollan mejor en condición aerobia, pues mediante la respiración obtienen más energía que en la fermentación, dado que, en la primera, la oxidación de los azúcares

es completa y éstos convergen a los productos CO_2 y agua. Sin embargo, en MCBMM con suministro de aire, *S. cerevisiae* presentó menor Cn_{\max} y deficiencia en sus parámetros cinéticos en comparación con su condición anaerobia. Como explicación a lo anterior, se tiene como hipótesis que en estado aerobio, el microorganismo oxida los nutrientes más fáciles de metabolizar (azúcares simples como sacarosa, glucosa y fructosa); al ser consumidos en su totalidad, el microorganismo emplea otras fuentes de carbono tales como proteínas y grasas, las cuales deben ser transformadas a moléculas más sencillas para poder obtener energía de ellas mediante el ciclo de Krebs; esto desfavorece la velocidad de su crecimiento y con ello, a los parámetros cinéticos. Afortunadamente, no existen alteraciones de concentración celular en la fase exponencial, pues la aireación favorece la oxidación completa de dichos nutrientes.

- La curva de crecimiento celular es una representación general de la proliferación típica de los microorganismos; sin embargo, no siempre se tiene un comportamiento ideal, tal como en el caso de la fase exponencial de *S. cerevisiae* en MCBMM sin aireación (ver figura 22), en la que se presenta una breve disminución en la concentración celular; la hipótesis para esto es que, una vez que los azúcares de fácil metabolización fueron consumidos en su totalidad, el microorganismo comenzó a emplear otras fuentes de carbono presentes en la melaza; esto causa un contratiempo en la reproducción celular y a su vez, un descenso transitorio de la población microbiana.

5.2. Recomendaciones.

- Monitorear el pH y temperatura de los medios de cultivo durante las cinéticas microbianas, para contar con más información acerca del comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en dichos medios de cultivo.
- Proponer concentraciones diferentes para los medios de cultivo preparados a base de melaza, 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 (10 g/L).
- Recolectar la biomasa de *S. cerevisiae* en los medios de cultivo a base de melaza y medio mínimo de sales, con el fin de determinar su composición nutricional mediante pruebas bromatológicas: determinación de humedad (secado), grasas (método de Soxhlet), proteínas (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.

Aquiahuatl, 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.

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: McGraw-Hill.

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 Maldonado, M. 2017. La biomasa microbiana como ingrediente en la nutrición acuícola. *Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola.* pp. 213-263.

Gutiérrez, H. y De la Vara, R. 2010. Análisis y diseño de experimentos. 2.^a edición. México: McGraw-Hill. p. 5.

Honig, P. 1974. Principios de tecnología azucarera. 2.^a edición. Compañía Editorial Continental. México. pp. 23-54.

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 1981. Industrialización de la caña de azúcar. Compendio No. 42. Bogotá, Colombia.

Jamieson, D. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive response to both hydrogen peroxide and menadione *J. Bacteriol.* 174 (20): 6678-6681.

Klug, W., Cummings, M. y Spencer, C. 2006. Conceptos de genética. 8.^a edición. España: Pearson Educación S. A. p. 154.

Lee, J. 2001. Chapter 6. Cell kinetics and fermenter design. En Biochemical Engineering. Washington, USA: Prentice-Hall.

Leeson, S., y Summers, J. 2000. Nutrición aviar comercial. Editorial Le´Print Club Express Ltda. Bogotá, Colombia. pp. 43-45.

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.^a edición. España: McGraw-Hill.

Puerta, G. 2010. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Centro Nacional de Investigaciones de Café “pedro Uribe Mejía” (Cenicafé). 1-12.

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.

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

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

Yepez, Y. 1995. Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad del etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S. A. Tesis de maestría. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. pp. 34-48.

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.

1. Material del laboratorio.

- Cámaras de Neubauer.
- Cubreobjetos.
- Émbolos (Jeringas con manguera).
- Pipetas graduadas de 0.1 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml.
- Pipetas graduadas de 5 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de ensayo.
- Gradilla para tubos de ensayos.
- Piseta de alcohol.
- Piseta de agua destilada.
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 1000 ml.
- Vasos de precipitado de 100 ml.
- Vasos de precipitado de 250 ml.

2. 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 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$).

3. Materia prima.

- Melaza de caña de azúcar (80 °Brix).

4. Equipo.

- Agitadores de rotación horizontal.
- Bombas de aire para pecera (2.4 L/min).
- Microscopios ópticos.
- Potenciómetro (pH-metro).
- Reguladores de electricidad.

5. ANOVA de dos factores.

ANOVA de dos factores: U (Y) vs. Medio de cultivo (X1), Aireación (X2)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Medio de cultivo (X1)	1	0.0061971	0.0061971	37.95	0.000
Aireación (X2)	1	0.0278307	0.0278307	170.41	0.000
Interacción	1	0.0237897	0.0237897	145.67	0.000
Error	8	0.0013065	0.0001633		
Total	11	0.0591240			

S = 0.01278 R-cuad. = 97.79% R-cuad. (ajustado) = 96.96%

