



## Evaluación de harina de soya como fuente primaria en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Evaluation of Soybean Meal as primary source for *Saccharomyces Cerevisiae* biomass production

Elvia Gómez <sup>b,\*</sup>, Ademar Estrada <sup>b</sup>, Judyth Bacilio <sup>b</sup>, Ana Castañeda <sup>b</sup>, Luis Miguel Alvarado <sup>b</sup>, Luder Valverde <sup>b</sup>, Wilson Wong <sup>b</sup>, Miguel Santa Cruz <sup>b</sup>, Guillermo Linares <sup>a</sup>

a. Departamento de Ciencias Agroindustriales (Universidad Nacional de Trujillo) Av. Juan Pablo II s/n Trujillo Perú.

b. Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de Trujillo) Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo Perú.

Autor para correspondencia: [elvia.folk21@hotmail.com](mailto:elvia.folk21@hotmail.com) (E. Gómez)

Recibido 28 Mayo 2015; Aceptado 19 Junio 2015

### RESUMEN

Se formuló un medio de cultivo para crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de Harina de Soja como fuente principal en dos concentraciones (35 y 47.97 % de proteína bruta) y se reforzó los medios con sacarosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), fosfato dibásico de Amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Tiosulfato de Sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), agua (H<sub>2</sub>O) y ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) utilizado como buffer en diferentes concentraciones según fueron los requerimientos, bajo flujos de aireación constantes de 0.51 VVM. La evaluación de la producción de biomasa se realizó mediante la cinética de crecimiento con el modelo de Gompertz. El crecimiento en el medio de cultivo con 47.97% de proteína mostró superioridad al medio de cultivo con 35% de proteína; caracterizado por una mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y menor tiempo de generación (TG) con valores de 0.86 h<sup>-1</sup> y 0.80 horas, 0.81 h<sup>-1</sup> y 0.86 horas respectivamente para cada medio de cultivo. Para la fase de adaptación ( $\lambda$ ) y mayor crecimiento máximo (a) se obtuvieron: 0.97 horas y 1.60 para el medio con 45.97% de Proteína, así como 0.63 horas y 1.46 para el medio con 35% de proteína en la harina de soya respectivamente. La prueba de ANOVA demostró diferencias estadísticas (p< 0.05; IC 95 %), y la prueba de Tukey, demostraron diferencias significativas entre el medio con 35% y 47.97% de proteína.

**Palabras clave:** Harina de soya, *Saccharomyces Cerevisiae*, biomasa, modelo de Gompertz.

### ABSTRACT

It was formulated a growth medium for *Saccharomyces Cerevisiae* from Soybean Meal as primary source in two protein concentrations (35 y 47.97 %) and as reinforcements: sucrose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), dibasic ammonium phosphate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), sodium thiosulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), water (H<sub>2</sub>O) and citric acid ((C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) as buffer in different concentrations according to the requirements, under constant aeration flow of 0.51 VVM. Evaluation of biomass production was performed by growth kinetics with the Gompertz model. The growth in the medium with 47.97% of protein showed superiority in the medium with 35% of protein; characterized by the greatest specific speed of *Saccharomyces cerevisiae* growth rate ( $\mu_{\text{máx}}$ ) and generation time (GT) of 0.86 h<sup>-1</sup> and 0.80 horas, 0.81 h<sup>-1</sup> and 0.86 hours respectively for each medium. For the adaptation phase ( $\lambda$ ) and the highest maximum growth (a) was obtained: 0.97 hours and 1.60 for the medium with 45.97% of Protein, as well as 0.63 hours and 1.46 for the medium with 35% of protein of Soybean Meal respectively. The ANOVA test demonstrated statistical significance (p< 0.05, IC 95 %). Comparative Tukey test showed statistical significance between the medium with 35% and 47.97% of protein.

**Keywords:** Soybean Meal, *Saccharomyces Cerevisiae*, biomass, Gompertz model.

## 1. Introducción

La obtención de etanol a nivel industrial utiliza por excelencia el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, por ser un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo y Sarmiento, 2008). Además es ampliamente utilizado en la elaboración de complementos nutricionales, saborizantes, vitaminas, panificación, producción de bebidas fermentadas como sake, licores, cerveza, vino; dándole al último características organolépticas que ninguna otra levadura puede hacer, formando así el cuerpo y aroma característico en el vino,. (Muñoz y Catrilaf, 2013). Otro aspecto que cobra gran importancia es la producción de biomasa a partir de la levadura en mención, ya que puede ofrecer una gran alternativa para reemplazar algunas de las fuentes tradicionales de proteína (harina de pescado, suero descremado de leche) para el consumo animal e incluso en porciones para humanos después de ser tratada; por ello el desarrollo e implementación de técnicas de producción industrial ayudarían a solventar el problema de la cada vez más limitada disponibilidad e ingesta de proteína (Phetteplace *et al.*, 2003).

Con el objetivo de satisfacer la demanda de éste microorganismo y ante el crecimiento de la demanda de Uva del mercado mundial se ha buscado una alternativa económicamente menos costosa y nutricionalmente de mejor calidad que dicho fruto para su utilización en medios de cultivos, el

mismo cabe destacar dista mucho de ser un medio de cultivo óptimo por la carencia de algunos nutrientes, presentando como principal escasez la proteína. (Mas *et al.*, 2013), razón por la que está siendo relegada de su utilización para la elaboración del mosto o medio de cultivo.

Entre los puntos de gran importancia para el desarrollo de este estudio están el diagnóstico microbiológico, el control de la calidad e inocuidad de los alimentos y el monitoreo del medio ambiente, que exigen cada vez más de medios de cultivo con mayor valor nutritivo y más rápido aislamiento e identificación de los microorganismos, todo lo cual ha propiciado la búsqueda de nuevas fuentes de nutrientes, sobre todo de origen vegetal (Rodríguez *et al.* 2004). En la búsqueda de un medio de cultivo que cumpla con las expectativas del mercado global, planteamos la Soya (*Glycine max*), la misma que representa un potencial competidor para la Uva en cuando a medios de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

El planteamiento se funda en que la soya ha sido ampliamente utilizada como fuente de proteína en alimentos, dado que presenta un buen balance en el perfil de aminoácidos y sobre todo es económicamente sustentable, ya que la disminución de costos en la producción de bioinoculantes crea condiciones favorables para su adopción, esto se basa en que el precio de la harina de soya comparada con el precio de uvas vinícolas en el mercado se muestra una gran diferencia favorable, siendo el precio de la Soya relativamente bajo. Además es considerada un buen sustrato para alimentos funcionales debido a que la fermentación es probiótica y tiene un potencial reductor de los niveles de carbohidratos (Champagne *et al.*, 2009; Sealey *et al.*, 2009).

Por las razones antes mencionadas, en este estudio se utilizó la harina de soya como materia prima para la elaboración

del medio de cultivo. Se debe mencionar también que la cantidad de proteínas presentes en su estructura, darán lugar a un nuevo termino llamado torta de harina de soya, el mismo que tendrá un contenido de proteína mínimo de 45% (ContiLatin, 2015; Obando, 2013).

Otro punto de gran importancia es la utilización de la microbiología predictiva de alimentos, la surge como alternativa a la necesidad de acortar tiempos de respuestas, reducir costos económicos, reemplazar metodologías dispendiosas y disminuir la laboriosidad en los análisis de la microbiología clásica de alimentos (Pérez, 2011). Permittiéndonos de esta manera, estimar el crecimiento, la supervivencia y/o la muerte de los microorganismos en relación a los factores críticos que los afectan, como lo son la temperatura, pH, actividad de agua y otros. Para su aplicación se han desarrollado modelos matemáticos que permitan predecir el comportamiento de las poblaciones microbiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* cuando crecen en condiciones controladas, estimando los parámetros cinéticos que caracterizan dicha curva.

En esta investigación se comparó la efectividad del uso de harina de soya como fuente de Nitrógeno para la producción de biomasa de *Saccharomyces Cerevisiae* en diversas concentraciones (35 y 47.97%).

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Materiales y equipos

Los medios de cultivo para *Saccharomyces Cerevisiae*, se diseñaron a partir de sacarosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), harina de soya (35 y 47.97% de proteína) proporcionada por la Empresa ContiLatin del Perú S.A., fosfato dibásico de Amonio  $(NH_4)_2HPO_4$ , ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), Tiosulfato de Sodio ( $Na_2S_2O_3$ ), agua ( $H_2O$ ) y ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) utilizado como buffer, pH metro, Balanza analítica, cocina,

refractómetro, Microscopio óptico 40X, Cámara Neubauer, Software Statistica 7.0.

### 2.2 Preparación de los medios de cultivo

En un recipiente se combinó los materiales, la harina de soya de 35% de proteína fue agregada lentamente y paralelamente se fue removiendo con el fin de no formarse ningún grumo por la harina de soya; así mismo para la harina de soya de 47.97% de proteína.

Enseguida se procedió a medir los grados Brix de los medios, los cuales fueron de 20 °Brix y con un pH de 6.2 y 6.5, respectivamente, luego se ajustó el pH con ácido cítrico hasta que llegase a un pH de 4.5. Posteriormente estas soluciones se colocaron en un balón de vidrio con algodón en la boca.

Paralelamente los medios de cultivo se esterilizaron en la autoclave a una temperatura de 120°C durante 15 minutos. Luego se dejaron enfriar los medios de cultivo (harina integral de 35 y 47.97% de proteína) hasta 30°C. Finalmente se agregó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente a los medios.

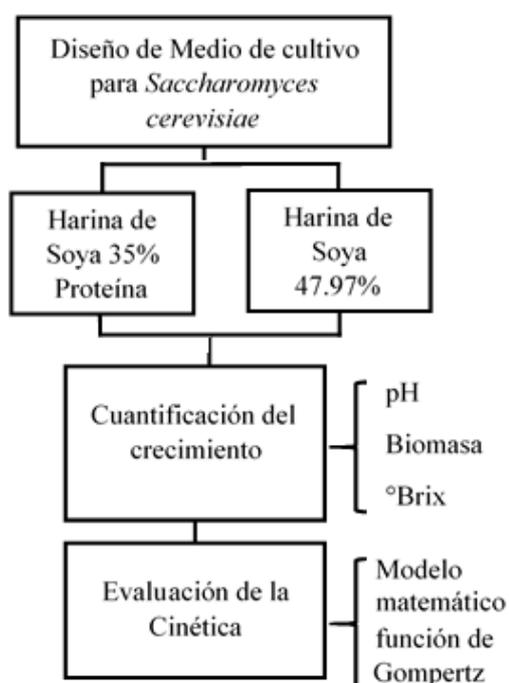
### 2.3 Crecimiento de las levaduras en el biorreactor

En seguida se agregaron estas soluciones al biorreactor, respectivamente, los cuales estaban en constante oxigenación (0.5113 VVM para ambos medios). Seguidamente por un lapso de 20 horas se extrajo muestras de ambos medios de cultivo (harina de soya de 35 y 47.97% de proteína) cada hora. La muestra extraída con una jeringa fue vertida en la cámara de Neubauer sobre una laminilla y luego fue colocada en el microscopio con un aumento de 40X y se realizó el conteo respectivo de células, de ambos cultivos.

Finalmente se procedió a realizar la respectiva curva de crecimiento para la producción de levadura de ambos cultivos.

## 2.4 Método experimental y análisis estadístico

La secuencia del desarrollo experimental se observa en la Figura 1. Se procedió a realizar los cálculos para los medios de cultivo (harina de soya con 35 y 47.97% de proteína), tomando en cuenta las necesidades de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Durante la producción de biomasa se controlaron los niveles de pH y °Brix. El crecimiento fue cuantificado empleando cámara Neubauer. Las medidas se realizaron cada media hora.



**Figura 1.** Desarrollo experimental para evaluar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando dos medios de cultivo de Harina de Soya al 35y 47% de proteína.

### Determinación de la biomasa y cinética de crecimiento

Se realizó mediante recuento celular (células/mL) y aplicación del modelo matemático de Gompertz [ $YA = a * \exp(-\exp(b-c*TA))$ ;  $YA = \log(N/N_0)$ ,  $TA = \text{tiempo (h)}$ ] (Nakashima *et al.*, 2000), obteniéndose los parámetros cinéticos de: crecimiento máximo (a), fase de adaptación ( $\lambda$ ), velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y tiempo de generación (TG). Se utilizó el

software Statistica para el modelamiento.

### Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza para evaluar las diferencias en los resultados de cada uno de los parámetros según la harina de soya utilizada. En los casos que se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) se realizó una prueba de Tukey.

## 3. Resultados y discusión

**Tabla 1.** Formulación de medios de cultivo para propagación de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de Harina de soya en diferentes concentraciones de proteína.

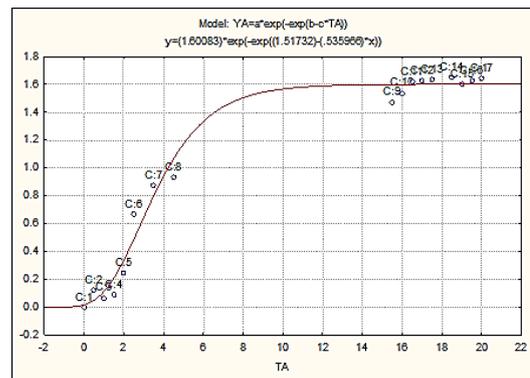
Componente	Medio 1 (35% Proteína (g))	Medio 2 (47.97% de Proteína(g))
Harina de Soya	100	100
Sacarosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	200	200
Fosfato Dibásico de Amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	15.79	4.74
Ácido Fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	0.62	7.51
Tiosulfato de Sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	9.43	9.045
Agua	800	800

Para la producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* se evaluaron 2 medios de cultivo usando como fuente principal harina de soya en concentraciones de proteína (35% y 47.97%). En la Tabla 1 se presenta la composición de los medios evaluados, calculados por balance de masa y ajustándose a lo citado por Gualtieri *et al.* (2007), quienes afirman que el crecimiento de la levadura se da a pH de 4.5 y 20°Brix. También Fajardo y Sarmiento (2008), indica que el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0, sin embargo se ha observado que con un pH inicial del

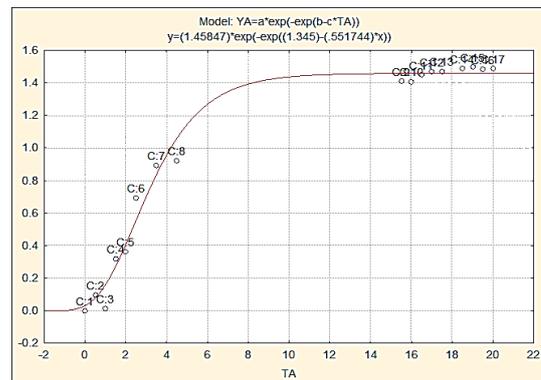
medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento, debido a que a pesar de la tolerancia bastante amplia de esta para las variaciones de pH, a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa.

Según Leveau y Bouix (2000) el carbono y nitrógeno son constituyentes principales aportados por el medio de cultivo. Este papel fue cubierto fundamentalmente por la sacarosa añadida junto con la harina de soya, que es rica en el porcentaje de proteína (fuente de nitrógeno).

Leveau y Bouix (2000) afirman también que el fósforo se halla incluido en los ácidos nucleicos y los nucleosidos di y tri-fosfato. El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones orto fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Las fuentes de fósforo utilizadas en los medios de cultivo fueron: fosfato dibásico de Amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). En la Tabla 2 se observa que el medio de cultivo con 47.97% de proteína en harina de soya usada como fuente primaria para producción de biomasa, permitió obtener mayor biomasa, con un mayor  $a=1.60$ ,  $\mu_{\text{máx}}=0.86 \text{ h}^{-1}$ , menor  $\text{TG}=0.81 \text{ h}$  y  $\lambda=0.97 \text{ h}$ ; cuyos valores fueron obtenidos del desarrollo del modelo matemático de Gompertz (Figura 2). Así también se muestra que para el medio de cultivo con 35% de proteína en harina de soya se obtuvieron los valores de:  $a=1.46$ ,  $\mu_{\text{máx}}=0.80 \text{ h}^{-1}$ , mayor  $\text{TG}=0.86 \text{ h}$  y  $\lambda=0.63 \text{ h}$  (Figura 3). Del ANOVA se determinó que la harina de soya con 35 % y 47.97 % presentan efecto significativo para todas las variables ( $p<0.05$ ). Lo mismo que se determinó en la prueba de Tukey, que se aplicó a todas las variables donde se comprobó la presencia de diferencias significativas entre los tipos de harina y las variables obtenidas referentes al crecimiento de dicha levadura.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (47.97% proteína).



**Figura 3.** Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (35.00% proteína).

Se determinó la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* tanto en el medio con 47.97 % y el de 35% de proteína en harina de soya. Se obtuvo una concentración elevada en un tiempo óptimo de fermentación de 20 horas en el medio de 35%; mientras que en el medio con 47.97% se obtuvo el aumento concentración en menor tiempo. Prueba de ello es la reducción de sacarosa expresada en grados Brix (Figura 5) donde se observa que para el Medio 2 (47.97% de proteína) la disminución fue rápida y más notoria en las últimas horas. Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos del risco *et al.*, 2005).

**Tabla 2.** Valores de  $a$ ,  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$ , Tg obtenidos en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de harina de soya en diferentes concentraciones comparado con medios de cultivo utilizados a partir de otras fuentes primarias.

Variable		$a \log(N/N_0)$	$\lambda$ (h)	$\mu_{(\max)}$ ( $h^{-1}$ )	TG (h)	$R^2$
Harina de Soya	35% prot.	1.4585*	0.6253*	0.8047*	0.8614*	0.9866*
	47% prot.	1.6008**	0.9652**	0.858**	0.8079**	0.9845**
	Mosto de uva <sup>a</sup>	1.5414	4.9513	0.2103	3.2954	0.9801
	Pulpa de café <sup>b</sup>	0.3444	1.1844	0.0422	16.4112	0.9877
	Melaza de caña <sup>c</sup>	1.7895	0.311	0.7293	0.9504	0.9907
	Agua de coco <sup>d</sup>	1.35	-	0.38	1.8241	0.9856

a: Cáceres y Reyna (2002); b: Gualtieri *et al.* (2007); c: Fajardo y Sarmiento (2008); d: Ramírez y Molina (2005)

\*, \*\* Valores con diferente superíndice son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) (Prueba de Tukey). ANOVA ( $p < 0.05$ ).

El elevado contenido de azúcares y demás fuentes de carbono garantizan la energía suficiente para multiplicar la biomasa microbiana en un período reducido de tiempo de 24 horas, lo que, sin duda, será de valor para las futuras formulaciones de medios específicos para el cultivo de esta levadura.

Para el caso del tiempo de generación (TG), Rosma y Ooi (2006), indica que los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. Los valores obtenidos fueron 0.80 y 0.86 horas (<1 hora), siendo valores bajos y aceptables según lo citado. Así es importante resaltar que entre los 2 medios es más favorable el TG del medio de cultivo con 47.97% de proteína de harina de soya debido a que el tiempo que precisa para duplicarse es menor que el otro medio.

Al analizar los resultados obtenidos, se puede discutir que las fuentes de crecimiento complejas utilizadas en el medio con 35% de proteína en harina de soya requieren de un gran número de reacciones metabólicas para degradar estos sustratos por el microorganismo; asegurando de esta manera la multiplicación efectiva de la bacteria por más tiempo en comparación con los sustratos utilizados en el medio con 47.97% de proteína; los cuales son degradados más rápidamente ocasionando

el consumo de estos en menor tiempo.

Si comparamos los datos obtenidos en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para ambos medios de cultivo a partir de harina de soya con resultados obtenidos por autores que utilizaron otras fuentes de sustratos se aprecian diferentes valores dependiendo del medio.

En la bibliografía existe diversas investigaciones en las que se trata de elaborar y/u optimizar medios de cultivo óptimos para el crecimiento de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, de los cuales seleccionamos aquellos que tienen como fuente principal a compuestos orgánicos que se muestren como una alternativa novedosa ya sea por sus contenidos de nutrientes o por el hecho de que su uso resuelve un problema de manejo de residuos, ya que estos al igual que el desarrollado en este trabajo, comparten la clasificación de medios alternativos, que se presentan como una solución a los elevados costos de un medio sintético, a excepción del medio de cultivo elaborado en base a jugo de uva el cual se toma como referencia por ser el medio tradicional, además también se prestó especial cuidado para la selección de aquellos que presentaban características de incubación (Temperatura, pH) similares a las utilizadas en el trabajo.

Cáceres y Reyna (2002) realizaron el modelamiento microbiológico para *Saccharomyces cerevisiae* utilizando

como única fuente de sustrato jugo de uva, sacarosa con agua frente a diversos valores de pH, Actividad de agua y temperatura; y obtuvieron para el mayor crecimiento máximo (a) 1.54, para la fase de latencia ( $\lambda$ ) 4.95 horas (Tabla 2). El valor de mayor crecimiento máximo que obtuvieron fue mucho menor al obtenido por los medios con harina de soya y el tiempo de latencia fue hasta 8 veces más que los obtenidos, demostrando la superioridad del uso de harina de soya como fuente primaria en producción de biomasa. De todos los medios analizados en la Tabla 2, es el analizado por Cáceres y Reyna (2002) (mosto de uva) el que posee mayor tiempo de adaptación ( $\lambda$ ). Comprobando así que el mosto de uva no cubre los requerimientos que precisa la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para su crecimiento. Además el tiempo de generación (TG) obtenido por dichos autores (3.30 h) fue mayor al de las harinas utilizadas en esta investigación. Pérez (2011), utilizo como fuente de sustrato, para un medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, diluciones de agua de coco suplementada con biotina. Obtuvieron resultados en cuanto a crecimiento de biomasa (g/L), utilizando coco al 100%, valores por encima a los que se obtuvieron usando un medio sintético común (Agar nutritivo). Para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) obtuvieron valores entre 0.022 y 0.1389 h<sup>-1</sup> estos valores fueron menores comparados con los obtenidos en el crecimiento con medios de cultivo a partir de harina de soya (0.80 y 0.86 h<sup>-1</sup>). Analizaron también el tiempo de generación (TG) y los valores oscilaron entre (4.99 y 31.5 horas); las horas necesarias para la duplicación que obtuvimos a partir del uso de harina de soya fueron menores a las obtenidas usando coco (0.80 y 0.86 horas). Ramírez y Molina (2005) analizó también el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con agua de

coco como sustrato y obtuvieron: 1.35 para mayor crecimiento máximo(a), 0.38 h<sup>-1</sup> para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) 1.82 h de TG. Valores también que demuestran la superioridad de la harina de soya como sustrato para el crecimiento de esta levadura.

Gualtieri *et al.* (2007) realizaron un estudio sobre la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida Utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica L.* y obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 2. Se observa que de todos los medios de cultivo mostrados fue este con el que se obtuvo menor crecimiento máximo (a) (0.34), menor velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) (0.0422 h<sup>-1</sup>) y mayor tiempo de generación (TG) (16.42 h) indicando que la pulpa de café presenta bajo desempeño como sustrato para medios de cultivos destinados al crecimiento de levaduras.

Entonces a mayor velocidad específica de crecimiento y rendimiento, el tiempo de duplicación es mucho menor.

Fajardo y Sarmiento (2008), realizaron una evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, los datos obtenidos se aprecian en la Tabla 2. En cuanto al tiempo de latencia o adaptación ( $\lambda$ ) (0.31 h) fue menor al obtenido por los medios de harina de soya (0.63 y 0.96 h), obtuvieron menor velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) (0.73 h<sup>-1</sup>) que las harinas de soya (0.81 y 0.86 h<sup>-1</sup>). Además el tiempo de generación por el medio a partir de melaza de caña fue 0.95 h, valor mayor a los requeridos por los dos tipos de harinas de soya empleadas (0.86 harina de 35% PB y 0.81 h harina de 47.97% PB). Esto indica que las levaduras requieren de más tiempo para poder duplicarse en un medio con melaza de caña que en otro con harina de soya.

Altamirano (2013) también realizó el estudio sobre la propagación de *Saccharomyces cerevisiae* en medio de

cultivo Mosto Cervecerero, su tiempo de crecimiento fue de 24 horas y su tiempo de generación (TG) fue de 1.42 horas, valor sumamente superior al obtenido en este trabajo (0.80 y 0.86 horas).

Los resultados de la Tabla 2 y lo citado anteriormente muestran que la harina de soya puede utilizarse como un excelente medio de cultivo, si se considera que la biomasa producida por unidad de volumen y la velocidad específica a la cual crecen las levaduras es superior a los valores encontrados en un medio sintético de uso común en laboratorio y también en medios a partir de residuos. Otros autores han reportado valores diferentes en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando otros medios de cultivo como es el caso de Mohamed *et al.* (1984), obtuvieron una biomasa de 9.4 g/L en un tiempo de 24 horas, utilizando un medio más complejo que contiene glucosa anhidra, extracto de levadura,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , ácido cítrico, citrato de sodio y un antiespumante. El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en los medios a partir de harina de soya se dio alrededor de 20 horas, siendo menor al tiempo obtenido por Mahamed *et al.* (1984). En cambio, Kong *et al.* (2007), reportó una concentración de biomasa de 0.864 g/L, utilizando solamente extracto de levadura.

En la Tabla 2 podemos ver los resultados de la cinética de crecimiento de las investigaciones seleccionadas, aquí se observa que para el caso de la producción de biomasa los medios a base de harina de soya muestran un rendimiento sumamente aceptable, en específico el correspondiente a la harina de soya (47% proteína) el cual supera a todos los medios a excepción de la melaza de caña, sin embargo vemos que el tiempo de generación en los medios con harina de soya son los más bajos de entre todos, además al analizar las velocidades específicas de crecimiento de la levadura en los distintos medios, se

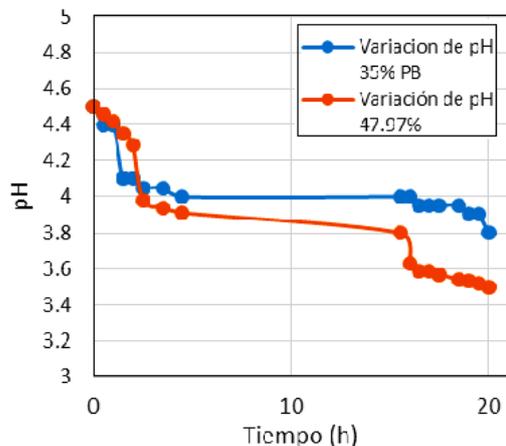
observa que son los medios desarrollados en base a la soya los que se muestran más beneficios para la producción de biomasa de la levadura, por esto consideramos que la utilización de harina integral de soya y harina de soya para la elaboración de medios de cultivo para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* se justifica debido a su menor costo en relación con los medios sintéticos y a sus mejores características con relación a otros medios alternativos.

Arteaga y Vásquez (2012) resaltan la importancia de realizar un seguimiento a los parámetros de pH y temperatura en el crecimiento microbiano. La figura 4 muestra la variación del pH a lo largo de la propagación de la levadura. Se observa que en la concentración de 47.97% de proteína el pH descendió hasta valores de 3.5, caso el pH descendió hasta 3.8.

Arteaga y Vásquez (2012) determinaron que el pH ejerce efecto positivo sobre la cantidad de células (cel/mL), el crecimiento máximo ( $\mu$ ), tiempo de generación (TG) y en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ). Pero ejerce un marcado efecto negativo en la fase de adaptación ( $\lambda$ ). Así pues se explica los resultados obtenidos en la Tabla 1, donde el tiempo de la fase de adaptación del medio de cultivo con 47.97% de proteína de harina de soya se vio influenciada negativamente por el rápido decaimiento del pH.

Gualtieri *et al.* (2007), establecieron como pH adecuado para el crecimiento de *Saccharomyces Cerevisiae* el valor de 4.5, razón que explicaría la obtención de tiempo de crecimiento microbiano de 20 horas debido a que el pH para ambos medios descendió hasta 3.5 - 3.8, limitando así el crecimiento microbiano. Para este caso Arteaga y Vásquez (2012) recomiendan para evitar la disminución de los valores de pH la aplicación de un control difuso de este parámetro en la propagación de levaduras, donde se mantendrá los

movimientos de potasio y protones, permitiendo que el pH intracelular se mantenga regulado, debido al reingreso de protones mediante un intercambio catión/protón y la salida de sodio o potasio.

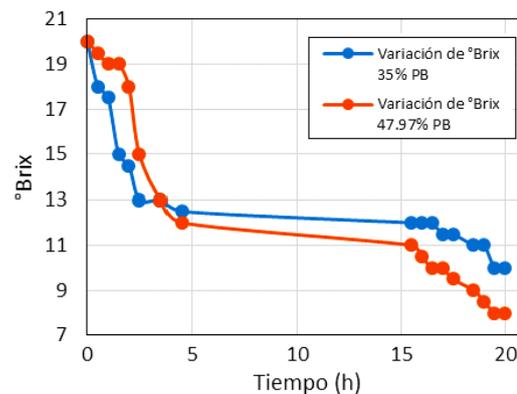


**Figura 4.** Variación del pH en producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en harina de soya con diferentes concentraciones de proteína.

Uribe (2007) reporta que para levaduras el crecimiento óptimo se presenta en el rango de 25 a 37°C, siendo 30°C la temperatura en la cual se ha encontrado mayor crecimiento, entre las cuales se encuentran las familias de *Saccharomyces* sin embargo para la investigación la temperatura de ambos tratamientos fue la de ambiente ( $24 \pm 4^\circ\text{C}$ ). Así la temperatura fue otra variable que limitó el tiempo de crecimiento de la levadura. El principal efecto de las altas temperaturas sobre las células es la desintegración de la membrana y la integridad de su pared. Sin embargo se sabe que los microorganismos incluyendo las levaduras, regulan la composición lipídica de la membrana en respuesta a la temperatura a la que están expuestas, con el fin de obtener una fluidez óptima en el interior y el exterior de la célula para un funcionamiento celular normal.

Así mismo, la concentración de oxígeno disuelto cambia aproximadamente 10 veces más rápido que la masa celular y la concentración del sustrato, por lo que

es la más importante variable fisiológica para el control y la optimización de fermentaciones (Gomes y Menawat, 2000).



**Figura 5.** Variación de en °Brix producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en harina de soya con diferentes concentraciones de proteína.

También Arteaga y Vásquez (2012), indican que la cantidad de oxígeno presenta efecto significativo ( $p < 0.05$ ). En tanto en el crecimiento máximo, en el tiempo de adaptación y la velocidad específica de crecimiento presentan efecto positivo; destacando así el papel fundamental de esta variable. Esta variable fue brindada en las mismas condiciones para ambos medios de cultivo (0.5113 VVM) por cual se logró la producción de biomasa. Este valor fue similar al utilizado por Zumbado et al. (2006), quienes sometieron a tres tipos de levaduras: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir* y *Saccharomyces cerevisiae* a crecimiento en suero de queso con un flujo de aireación de 0.6 VVM a 30°C.

Wang et al. (2010) encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa al trabajar en rangos de 30 a 50% de saturación de OD y que por encima de 50% no se evidencia diferencia significativa. Yao et al. (2001), refieren que la inhibición de alto nivel de oxígeno podría ocurrir durante la fase de crecimiento muy temprano y el efecto depresivo de la baja disponibilidad de oxígeno se limitaba al resto del proceso, lo que sugiere que las etapas de fermentación

requiere diferentes concentraciones de oxígeno disuelto; una buena disponibilidad de oxígeno estimula la captación de glucosa y de los fosfatos; en tanto la reducida disponibilidad puede dar lugar a la excreción de ácido láctico y ácido acético metabolitos que limitan la producción de biomasa.

#### 4. Conclusiones

El uso de harina de soya como fuente de Nitrógeno para la producción de biomasa de *Saccharomyces Cerevisiae* con concentración de 47.97 % de proteína presentó un mejor desempeño comparado con la utilización de harina de soya con una concentración menor de proteína (35%). El uso de esta harina (47.97%) permite obtener la mayor producción de biomasa *Saccharomyces Cerevisiae* con mayores valores de  $\mu=1.60$ ,  $\mu_{\text{máx}}=0.86 \text{ h}^{-1}$ . Así como menores valores de  $\text{TG}=0.81 \text{ h}$  y  $\lambda=0.97 \text{ h}$ .

Además se comprobó la importancia de la harina de soya como fuente primaria en la producción de biomasa de *Saccharomyces Cerevisiae* en comparación del uso otros medios de sustratos.

#### Referencias

Altamirano, C. 2013. Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto. Tesis para optar por el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/552/1/Altamirano\\_cc.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/552/1/Altamirano_cc.pdf).

Arteaga, H.; Vásquez, V. 2012. Control difuso del oxígeno disuelto, pH y temperatura de un biorreactor columna de burbujas en la producción de biomasa de *Candida utilis*. Scientia Agropecuaria 2(2012) 139 – 148.

Cáceres, J.; Reyna, A. 2002. Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para optar por el título de Ingeniero de producción

Agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad de la Sabana. Bogotá.

Champagne, C.; Green-Johnson, J.; Raymond, Y.; Barrette, J.; Buckley, N. 2009. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. Food Research International 42:612-621.

ContiLatin. 2015. Especificaciones técnicas de producto terminado: harina integral de soya. ContiLatin del Perú: Perú.

Fajardo, E.; Sarmiento, S. 2008. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obtener el Título de Microbiólogo industrial Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá.

Gomes, J.; Menawat, A. 2000. Precise control of dissolved oxygen in bioreactors-a model-based geometric algorithm. Chemical Engineering Science 55: 67-68.

Kong, Q.; Cao, L.; Zhang, A.; Chen, X. 2007. Overexpressing GLT1 in *gdp1* mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces Cerevisiae*. Applied Microbiol Biotechnology 73: 1382-1386.

Leveau, J.; Bouix, M. 2000. Microbiología Industrial, los microorganismos de interés industrial. Editorial ACRIBIA, S.A. p: 3-88, 529-559.

Mas, A.; Beltrán, G.; Sancho, M.; Gutiérrez, A.; Chiva, R.; Guillamón, J. 2013. Metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación vínica. Revista de Enología Científica y Profesional.

Mohamed, A.; Munir, C. 1984. Ethanol production in a hollow fiber bioreactor using *Saccharomyces Cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology 20:100-104.

Muñoz, M.; Catrila G. 2013. Estimación de parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en sistema de fermentación batch bajo distintas condiciones de crecimiento. Universidad Tecnología de Chile: Chile. Disponible en: [http://www.researchgate.net/publication/257310255\\_Estimation\\_of\\_kinetic\\_parameters\\_of\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_in\\_batch\\_fermentation\\_during\\_different\\_growth\\_conditions](http://www.researchgate.net/publication/257310255_Estimation_of_kinetic_parameters_of_Saccharomyces_cerevisiae_in_batch_fermentation_during_different_growth_conditions).

Nakashima, S.; André, C.; Franco, B. 2000. Revisão: Aspectos básicos da microbiologia preditiva. Brazilian Journal of Food Technology 3: 41-51.

Obando, M. 2013. Ficha Técnica: torta de soya. El Forraje. Disponible en:

- <http://www.elforraje.com/wp-content/uploads/2013/08/FIT-AQ-011-FICHA-TECNICA-TORTA-DE-SOYA.pdf>.
- Pérez, J. 2011. Evaluación del efecto de diferentes diluciones de agua de coco suplementada con Biotina para la producción de Levadura (*Saccharomyces Cerevisiae*) a nivel de matraz y en biorreactor de tanque agitado. Tesis para optar por el grado de maestro en tecnología en agroindustria. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Córdoba, Veracruz.
- Phetteplace, H; Jarosz, M; Uctuk, D.; Sporleder, R. 2003. Evaluation of single cell protein as a protein supplement for finishing cattle. Disponible en: [http://www.researchgate.net/publication/237501219\\_Evaluation\\_of\\_Single\\_Cell\\_Protein\\_as\\_a\\_Protein\\_Supplement\\_for\\_Finishin\\_Cattle](http://www.researchgate.net/publication/237501219_Evaluation_of_Single_Cell_Protein_as_a_Protein_Supplement_for_Finishin_Cattle).
- Ramírez, O.; Molina, M. 2005. Evaluación de Parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. Ingeniería 15(2):91-102.
- Ríos del Risco, A.; Fajardo, M.; Pérez, J. 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis Mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.
- Rodríguez, C.; Zhurbenko, R.; Quesada, J.; Lobaina, T.; Tsoraeva, A.; Díaz, M. 2004. Manual de Medios de Cultivo. Tercera Edición. BioCen.
- Rosma, A.; Ooi, K. 2006. Production of Candida utilis Biomass and Intracellular Protein Content: Effect of Agitation Speed and Aeration Rate. Malaysian Journal of Microbiology 2(2): 15-18.
- Sealey, W.; Barrows, F.; Smith, C.; Overturf, K.; La Patra, S. 2009. Soybean meal level and probiotics in first feeding fry diets alter the ability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to utilize high levels of soybean meal during grow-out. Aquaculture 293:195-203.
- Uribe, L. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filosfera de mora. Trabajo de grado para obtener el título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Yao, H.; Tian, Y.; Tade, M.; Ang, H. 2001. Variations and modelling of oxygen demand in amino acid production. Chemical Engineering and Processing 40: 401-409.
- Wang, Y. H.; Fang, X. L.; Li, Y. P.; Zhang, X. 2010. Effects of constant and shifting dissolved oxygen concentration on the growth and antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila*. Bioresource Technology 101(19): 7529-7536.
- Zumbado, W.; Esquivel, P.; Wong, E. 2006. Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso. Agronomía Mesoamericana 17(2): 151-160.

