



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA**

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA  
SALUD**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**TEMA:**

**UTILIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR  
(*Saccharum officinarum* L.) COMO MEDIO DE CULTIVO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces boulardii* L.,  
MACHALA 2014.**

**AUTOR:**

Vicente Armando Espinoza Ordoñez

**TUTOR:**

Dr. Hugo Romero Bonilla, Mg. Sc.

**MACHALA – EL ORO – ECUADOR**

**2015**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo de titulación titulado “ **UTILIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces boulardii* L., MACHALA 2014** fue elaborado por **VICENTE ARMANDO ESPINOZA ORDOÑEZ** con sugerión a las normas de proyectos de investigación, por lo que autorizo su presentación.

---

Dr. Hugo Romero Bonilla, Mg. Sc.

**TUTOR**

## **CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA**

Yo, **VICENTE ARMANDO ESPINOZA ORDOÑEZ** con cédula de identidad 070452407-3, egresado de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala responsable del presente trabajo de titulación, titulada **“UTILIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces boulardii* L., MACHALA 2014.”**, certifico que la responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones expuestos en el presente trabajo pertenecen exclusivamente a mi autoría, una vez que ha sido aprobada por mi tribunal de sustentación de trabajo de titulación autorizando su presentación.

Deslindo a la Universidad Técnica de Machala de cualquier delito de plagio y cedo mis derechos de autor a la Universidad Técnica de Machala para que ella proceda a darle el uso que crea conveniente.

---

Egdo. Vicente A. Espinoza Ordoñez.

CI: 070452407-3

## **RESPONSABILIDAD**

Yo, **VICENTE ARMANDO ESPINOZA ORDOÑEZ** certifico que la responsabilidad de la investigación, los resultados y conclusiones del presente trabajo de titulación titulado “ **UTILIZACIÓN DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR** (*Saccharum officinarum* L.) **COMO MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces boulardii* L., MACHALA 2014** ” pertenecen exclusivamente al autor.

---

Egdo. Vicente A. Espinoza Ordoñez.

CI: 070452407-3

## **DEDICATORIA**

### **A Dios.**

Primordialmente por ser mi baluarte en mis instantes de debilidad y ofrecerme una vida infinita de aprendizajes, experiencias, adversidades, guiándome por el buen camino dándome fortaleza para no desmayar en mí caminar diario y así con el permiso de él haber alcanzado uno de mis objetivos en esta etapa como profesional.

### **A mi madre María Ubaldina.**

Por ser el pilar fundamental en la superación espiritual y académica, mía y de todos mis hermanos y hermanas, brindándonos sus valioso consejos y a su vez transmitiendo valores íntegros como seres humanos para bien de la sociedad, pero más que nada por su infinito amor.

### **A la memoria de mi padre Enrique.**

Con su ejemplo de lucha, entrega y constancia diaria que lo caracterizaron para disfrutar de un triunfo a cada instante en el diario caminar, el cual me fue infundido desde siempre, por la entereza demostrada para salir adelante.

### **A mis Hermanos.**

Oswaldo, Mario, Sandra, Maritza por el apoyo incondicional brindado en el transcurso de mi etapa como estudiante, apoyándome ya sea en un sentido moral o económico, gracias por el apoyo brindado.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradeciendo a Dios por acompañarme a lo largo de mi carrera universitaria, y protegiéndome durante toda la jornada dándome fuerzas para prevalecer ante los obstáculos y dificultades, por bendecirme para alcanzar mis metas, por concluir uno de mis sueños anhelados ser un profesional.

A mis padres Enrique y María Ubaldina que me han inculcado a no desistir ni rendirme por alcanzar mis metas y siempre por haberme brindado la oportunidad de tener una excelente educación en este intervalo de mi vida. Y ponderalmente ser un excelente ejemplo de vida a seguir, de lucha y entrega.

A mis hermanos Oswaldo, Mario, Sandra, Maritza por acompañarme en todo este arduo caminar de universitario compartiendo mis altos y bajos, apoyándome reiteradamente en mis tropiezos y aplaudiendo mis logros.

A mi director de tesis, Dr. Hugo Romero Bonilla por su esfuerzo y dedicación, quien siempre creyó en mí, más que como ser humano como un amigo brindándome sus conocimientos, experiencia, y consejos para la realización de este trabajo de titulación y así obtener el título de Bioquímico Farmacéutico.

Quiero brindar un agradecimiento especial al Ingeniero en alimentos Humberto Ayala el cual más que un excelente catedrático una gran persona e intachable amigo el cual guio parte de mi investigación realizada.

A mis compañeros de aulas y en especial con los que convivimos muchas hazañas estudiantiles dentro de nuestra alma mater: Fidel, Hoover, Cristopher, Viviana, Jessenia y Andrea gracias por expresarme su apoyo y demostrar que podemos ser grandes amigos y compañeras de trabajo a la vez.

Son varias las personas que han formado parte de mi vida universitaria a las cuales les agradezco su invaluable amistad, recomendaciones, sostén y compañía en los diversos momentos de mi vida como estudiante.

*Vicente Armando*

## Contenido

|   |     |
|---|-----|
| CERTIFICACIÓN.....  | ii  |
| CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA.....                            | iii |
| RESPONSABILIDAD .....   | iv  |
| DEDICATORIA .....   | v   |
| AGRADECIMIENTOS .....   | vi  |
| RESUMEN .....   | x   |
| ABSTRACT.....   | xi  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 12  |
| PROBLEMA .....  | 2   |
| JUSTIFICACIÓN .....   | 3   |
| OBJETIVOS.....  | 4   |
| Objetivo General .....  | 4   |
| Objetivo Específicos .....                                    | 4   |
| HIPÓTESIS.....  | 5   |
| Hipótesis Alternativa.....                                    | 5   |
| Hipótesis Nula .....  | 5   |
| 1. MARCO TEÓRICO.....   | 6   |
| 1.1. CAÑA DE AZÚCAR ( <i>Saccharum Officinarum L.</i> ) ..... | 6   |
| 1.1.1. Nombre Científico.....                                 | 6   |
| 1.1.2. Etimología.....  | 6   |
| 1.1.3. Nombre Común.....                                      | 6   |
| 1.1.4. Clasificación.....                                     | 7   |
| 1.1.5. Propiedades .....                                      | 7   |
| 1.1.6. Composición .....                                      | 8   |
| 1.1.7. Usos del Jugo de Caña de Azúcar .....                  | 10  |
| 1.2. LEVADURAS .....  | 10  |
| 1.2.1. Clasificación.....                                     | 11  |
| 1.2.2. Características Fisiológicas.....                      | 12  |
| 1.2.2.1. <i>Temperatura</i> .....                             | 12  |
| 1.2.2.2. <i>Oxígeno</i> .....                                 | 12  |
| 1.2.2.3. <i>pH</i> .....                                      | 12  |
| 1.2.2.4. <i>Nutrientes</i> .....                              | 13  |
| 1.3. <i>Saccharomyces boulardii L.</i> .....                  | 14  |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.3.1.   | Clasificación Científica (Henri Boulard) .....                  | 15 |
| 1.3.2.   | Requerimiento Nutricional .....                                 | 15 |
| 1.4.     | PROCESO DE FERMENTACIÓN .....                                   | 16 |
| 2.4.1.   | tipos De Fermentación .....                                     | 16 |
| 2.4.1.1. | <i>Fermentación Discontinua</i> .....                           | 16 |
| 2.4.1.2. | <i>Fermentación Alimentada (fed - batch)</i> .....              | 17 |
| 2.4.1.3. | <i>Fermentación Continúa</i> .....                              | 18 |
| 2.4.2.   | Factores que Regulan el Proceso de Fermentación .....           | 18 |
| 2.       | METODOLOGÍA .....   | 20 |
| 2.1.     | LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN .....                                 | 20 |
| 2.2.     | TIPO DE INVESTIGACIÓN .....                                     | 20 |
| 2.2.1.   | Investigación Descriptiva .....                                 | 20 |
| 2.2.2.   | Investigación Experimental .....                                | 21 |
| 2.3.     | DISEÑO EXPERIMENTAL .....                                       | 21 |
| 2.3.1.   | Población, Muestra y Selección de la Muestra .....              | 21 |
| 2.3.2.   | Toma de Muestra .....   | 21 |
| 2.4.     | DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....                                | 22 |
| 2.5.     | DESARROLLO EXPERIMENTAL .....                                   | 22 |
| 2.5.1.   | Preparación de los Biorreactores .....                          | 22 |
| 2.5.2.   | Preparación del Inóculo .....                                   | 23 |
| 2.5.3.   | Fermentación Tipo Bach .....                                    | 23 |
| 2.6.     | MÉTODOS ANALÍTICOS .....  | 24 |
| 2.6.1.   | Cenizas (INEN. 0035:2012) .....                                 | 24 |
| 2.6.2.   | Porcentaje de Humedad (INEN 0777:1985) .....                    | 25 |
| 2.6.3.   | Determinación de °Brix (NMX-F-436-SCFI-2011) .....              | 26 |
| 2.6.4.   | Determinación del pH (NMX-F-317-S-1978) .....                   | 27 |
| 2.6.5.   | Determinación del Oxígeno Disuelto (NMX-AA-012-SCFI-2001) ..... | 28 |
| 2.6.6.   | Determinación de la Conductividad (NMX-AA-093-SCFI-2000) .....  | 28 |
| 2.6.7.   | Determinación de Azúcares Reductores Totales .....              | 29 |
| 2.7.     | DETERMINACIÓN DE BIOMASA .....                                  | 30 |
| 2.8.     | RECURSOS EMPLEADOS .....  | 31 |
| 2.8.1.   | Recursos Humanos .....  | 31 |
| 2.8.2.   | Recursos Físicos .....  | 31 |
| 2.8.3.   | Materiales .....  | 31 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.8.4. | Material de Laboratorio .....  | 31 |
| 2.8.5. | Equipos .....  | 32 |
| 2.8.6. | Reactivos .....  | 32 |
| 2.8.7. | Varios.....  | 33 |
| 3.     | RESULTADOS .....   | 34 |
| 3.1.   | CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR.....  | 34 |
| 3.2.   | EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA LEVADURIFORME. ....             | 35 |
| 3.3.   | DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS (°BRIX, pH, TEMPERATURA, OXÍGENO DISUELTO, CONDUCTIVIDAD, AZUCARES REDUCTORES, °GL) ..... | 36 |
| 3.3.1. | Caracterización Cromatografía del Fermentado de Jugo de Caña. ....   | 42 |
| 3.4.   | DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE BIOMASA PRODUCIDA A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DEL JUGO DE CAÑA.....                                      | 44 |
| 4.     | CONCLUSIONES .....   | 46 |
| 5.     | RECOMENDACIONES .....  | 48 |
| 6.     | BIBLIOGRAFÍA.....  | 49 |
|        | ANEXOS .....   | 54 |

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la utilización del jugo de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Saccharomyces boulardii* L. y la producción de etanol. La caña de azúcar es una planta herbácea que se cultiva en la región costa del Ecuador durante todos los meses del año, por lo cual se planteó el uso de caña de azúcar ya que esta presenta ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivo comerciales como el caldo YPG (Extracto de levadura, Peptona y Glucosa), el cual es utilizado normalmente para la obtención de biomasa, levaduriforme. El experimento se lo realizó tomando muestras de jugo de caña (*Saccharum officinarum* L.) se la debe realizar tras un proceso físico de extracción (molienda) del jugo, ya cuando la caña de azúcar ha alcanzado su estado adecuado de madurez (6 meses), posteriormente se lo esterilizó y procedió a inocular la levadura en dos concentraciones diferentes, 2 y 2,5 g/L. La cuantificación de la biomasa producida se la realizó mediante espectrofotometría UV-Visible, determinando que el tratamiento 1 aumenta de 2 a 2,31 g/L y en el tratamiento 2 se reduce desde 2,5 a 2,39 g/L, el análisis estadístico nos indica que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la producción de biomasa levaduriforme. En conclusión el jugo de caña de azúcar no es un sustrato idóneo para la producción de biomasa levaduriforme.

**Palabras clave:** Jugo de caña, *Saccharomyces boulardii*, levaduriforme, biomasa

## ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the use of sugar cane juice as a substrate for the production of *Saccharomyces boulardii* L. and ethanol production. Sugar cane is a herbaceous plant that grows in the coastal region of Ecuador during all months of the year, so the use of sugarcane was raised because this has economic and nutritional advantages over other means of commercial cultivation as YPG broth (Yeast extract, peptone and glucose), which is normally used for obtaining yeast-biomass. The experiment was conducted by sampling the cane juice (*Saccharum officinarum* L.) should be performed after a physical extraction process (grinding) of the juice, and when sugar cane has reached its proper state of maturity (6 months) then I would sterilize and proceeded to inoculate the yeast at two different concentrations, 2 and 2.5 g / L. Quantification of the biomass produced is performed by UV-Visible spectrophotometry, determining that treatment 1 increases from 2 to 2.31 g / L and in treatment 2 is reduced from 2.5 to 2.39 g / L, Statistical analysis indicates that there is no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the production of yeast-biomass. In conclusion the sugar cane juice is not a suitable substrate for the production of biomass

**Keywords:** cane juice, *Saccharomyces boulardii*, yeastlike, biomass

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador en su región costa se ha caracterizado por las cosechas de caña de azúcar durante todo el año, lo que hace importante aprovechar al máximo materias primas como el jugo de caña para la producción de biomasa y para la obtención de diferentes productos biotecnológicos por vías fermentativas. Se prefiere el uso de caña de azúcar ya que esta presenta ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivo comerciales como el caldo YPG (Extracto de levadura, Peptona y Glucosa), el cual es utilizado normalmente para la obtención de biomasa levaduriforme. En los últimos 5 años se ha venido mejorando la salud humana, nivelando la carga microbiana intestinal mediante la inclusión de microorganismos vivos como los probióticos, los cuales regulan la microflora intestinal, aumentan la asimilación de los alimentos (Ashayerizadeh, Dastar, Shargh, Ashayerizadeh, & Mamooee, 2009; Musa, Wu, Zhu, Seri, & Zhu, 2009; Sayan & Bhattacharyya, 2013; Hernández & Borrell, 1993), reducen niveles de colesterol y estimulan el desarrollo del sistema inmune entre otras características. Es por esta razón, la *Saccharomyces boulardii* ha sido frecuentemente utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica, por lo que la producción de biomasa a gran escala se convierte en un factor primordial para el desarrollo biotecnológico del país. En Ecuador, el uso del jugo de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces boulardii* es una alternativa válida ya que reduce costos para industrias nacionales y además evita el frecuente uso de productos importados que incrementan costos en procesos biotecnológicos. El presente trabajo de investigación plantea la caracterización, evaluación y experimentación a nivel de laboratorio para obtener la mayor cantidad de biomasa levaduriforme, realizando paralelamente un seguimiento de la viabilidad y el consumo de sustrato.

## **PROBLEMA**

En la provincia de El Oro existe la producción artesanal de etanol para consumo humano con métodos físicos empíricos, los cuales no aprovechan en su totalidad la materia prima usada para la elaboración del alcohol, dicha materia prima utilizada para la elaboración del etanol es el jugo de caña proveniente de la molienda de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) la cual es un desperdicio de los recursos vegetales.

En la actualidad con los avances tecnológicos y descubrimientos microbiológicos, llamados así biotecnología se puede remediar la ineficiencia de estos métodos antiguos para la obtención de etanol, además de obtener en los procesos de alcoholes, podemos conseguir subproductos beneficiosos para la salud humana, más que todo en el campo de la medicina específicamente en pediatría, tal como la *Saccharomyces boulardii L.* utilizada para contrarrestar la enfermedades gastrointestinales.

Estos microorganismos denominados probióticos utilizados en la cura de enfermedades entéricas tales como fiebre tifoidea, disentería entre otras ocasionadora de diarreas continuas, provocadas por la alta flora patógena existente en nuestro estómago las cuales no pueden llevar a la muerte. Uno de estos microorganismos pro bióticos de mayor utilización en los niños son (*Saccharomyces boulardii L*) las cuales contrarrestan los síntomas ayudando a un tratamiento y prevención de desórdenes intestinales tanto en animales como en humanos.

Entendidos que la familia de los *Saccharomyces* son productores del alcohol, el presente trabajo pretende la utilización de estos microorganismos como productores de etanol a partir del jugo de caña como su medio de sustrato además de la obtención de masa levaduriforme, la cual de una manera aséptica ayudará a menguar los índice de enfermedades entéricas en niños.

## JUSTIFICACIÓN

Mediante esta investigación se pretende fomentar en la provincia de El Oro, la utilización de diversos recursos para la obtención de alcohol artesanal, además de obtener otros productos para la salud humana como pro bióticos.

Los sustratos para la obtención de microorganismos eficientes *Saccharomyces boulardii* L. en el mercado tienen un costo elevado, tal es el caso del medio de YPG (extracto de levadura, Peptona y Glucosa) el cual es utilizado como base para la obtención de biomasa levaduriforme; este es un medio sintético muy comercial que ya viene procesado y enriquecido con fuentes de nitrógeno y carbono, principalmente que contienen extractos de levadura y peptona además de glucosa respectivamente. No obstante debido a los constituyentes del YPG primariamente el extracto de levadura, consecuentemente es un medio costoso al pretender obtener biomasa a grandes escalas.

Se pretende con este proyecto sustituir la producción de *Saccharomyces boulardii* L. en medio YPG por la utilización del jugo de caña de azúcar, la cual contiene ventajas económicas y nutricionales para el crecimiento de las levaduras. Asimismo el jugo de caña contiene compuestos que favorecen vertiginosamente al desarrollo de la biomasa, tales como altos contenidos de carbohidratos (azúcares), aminoácidos, vitaminas entre otros.

Con el uso de este sustrato se pretende menguar los costos de la producción de biomasa levaduriforme a gran escala, además de obtener alcohol en el proceso de obtención de la biomasa y utilizando adecuadamente los recursos orgánicos sustentables.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Utilizar el jugo de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Saccharomyces boulardii* L. y la producción de etanol.

### **Objetivo Específicos**

- Caracterización fisicoquímica de la materia prima (jugo de caña de azúcar)
  
- Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de microorganismos con el fin de seleccionar la más adecuada para la producción de biomasa levaduriforme a corto plazo.
  
- Determinar los parámetros fisicoquímicos (°Brix, pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, azúcares súper reductores, sólidos solubles y grados alcohólicos) que suceden en la reacción fermentativa.
  
- Determinar la cantidad de biomasa producida a partir de la fermentación del jugo de caña.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis Alternativa**

Es posible la producción de biomasa (*Saccharomyces boulardii* L.), a partir de la fermentación anaerobia del jugo de caña de azúcar.

### **Hipótesis Nula**

No es posible la producción de biomasa (*Saccharomyces boulardii* L.), a partir de la fermentación anaerobia del jugo de caña de azúcar.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum Officinarum L.*)

Son plantas cespitosas con tallos de hasta 5 m x 2-5 cm, con numerosos entrenudos alargados vegetativamente, dulces y jugosos, desnudos abajo. Vainas glabras o pelosas; ligula de 2-4 mm; láminas 1-2 m x 2-6 cm, glabras o la costilla media pelosa. Panícula 25-50 cm; pedúnculo glabro o densamente puberulento; eje glabro o peloso; entrenudos del raquis de 5 mm, glabros. Espiguillas 3-4 mm, agudas, con tricomas de hasta 7 mm; gluma inferior glabra; lema inferior ciliada in el 1/2 superior; lema superior y arista generalmente ausentes; anteras 3, 1.5-2 mm (CONABIO, 2009).

### 1.1.1. Nombre Científico

*Saccharum officinarum L.* (Ruíz, 1995)

### 1.1.2. Etimología

**Saccharum:** nombre genérico que deriva del griego *sakcharon*, "azúcar", y otras palabras similares en malayo y sánscrito para "azúcar o el jugo de la caña de azúcar". (Cowan, 1983).

**Officinarum:** epíteto latino que significa "vendido como hierba medicinal". (Darke, 1999)

### 1.1.3. Nombre Común

Caña de azúcar, conocida con otros nombres como caña de castilla, caña dulce, cañaduz, caña melar, cañamiel y Sa-kar.

#### **1.1.4. Clasificación**

La caña de azúcar está ubicada taxonómicamente de la siguiente manera: (Ruíz, 1995)

DIVISIÓN: Embryophita siphonogama

SUBDIVISIÓN: Angiospermae

CLASE: Monocotyledoneae

ORDEN: Glumiflorae

FAMILIA: Gramineae

TRIBU: Andropogonae

SUBTRIBU: Saccharae

GENERO: Saccharum

ESPECIE: Officinarum L.

#### **1.1.5. Propiedades**

En cuanto al aporte nutricional, es un alimento con un alto contenido en hidratos de carbono y calorías. El resto de nutrientes presentes en este alimento, ordenados por relevancia de su presencia, son: calcio, potasio, hierro, magnesio, vitamina B3, sodio, selenio, fósforo, cinc, vitamina B6, vitamina B, agua, vitamina B2 y vitamina B9. (Villa, 2014)

Por su contenido en hidratos de carbono, la caña de azúcar es un alimento ideal para el aporte energético, pues se estima que el 55-60% de la energía diaria que necesitamos debe provenir de carbohidratos, bien por la ingesta de alimentos ricos en almidón, bien por las reservas de glucógeno presentes en nuestro organismo. Además, la principal energía que necesita el cerebro para funcionar es la glucosa, que encontramos en alimentos ricos en carbohidratos.

Gracias al carácter hidrofílico de los carbohidratos, este alimento constituye también una fuente de obtención rápida de energía, al ser fácilmente atacado por las enzimas hidrolíticas. (Villa, 2014).

La presencia en nuestra dieta de alimentos con alto valor energético como la caña de azúcar favorecerá el mantenimiento de las funciones vitales y la temperatura corporal de nuestro cuerpo, así como el desarrollo de la actividad física, a la vez que aportará energía para combatir posibles enfermedades o problemas que pueda presentar el organismo. El exceso de calorías sólo es recomendable en circunstancias especiales como épocas de crecimiento y renovación celular, y en personas que realizan una actividad física intensa o padecen situaciones estresantes como enfermedad o recuperación tras una intervención quirúrgica. (Villa, 2014).

#### **1.1.6. Composición**

Los jugos de la caña de azúcar contienen pequeñas cantidades de almidón, aproximadamente entre 50 y 70 mg/l, en forma de gránulos, los cuales durante la molienda se separan del tejido vegetal y se solubilizan en forma de dos estructuras moleculares: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es esencialmente un glucano lineal con enlaces de glucosa  $\alpha(1,4)$  y la amilopectina, aunque es también un glucano, exhibe uniones  $\alpha(1,4)$  asociadas con una estructura altamente ramificada de enlaces  $\alpha(1,6)$ . Además de los almidones, se han aislado de los jugos de la caña fresca otros polisacáridos como el I.S.P., identificado en Louisiana (Clarke, Roberts, & y Godshall, 1986), el cual por hidrólisis produce arabinosa, galactosa, glucosa, manosa, xilosa y pequeñas cantidades de rhamnosa. Durante la fase de purificación del I.S.P. es posible detectar también la presencia de otro polisacárido de estructura similar a la amilopectina y al glicógeno, pero de inferior peso molecular, conocido actualmente como el glucano de Robert (Clarke, Roberts, & y Godshall, 1986).

**Cuadro 1.** Promedio de la composición química de los tallos y de los jugos de la caña de azúcar.

| <b>CONSTITUYENTES</b>    | <b>PORCENTAJES</b> |
|--------------------------|--------------------|
| <b>En los tallos:</b>    |                    |
| Agua                     | 73 – 76            |
| Solidos                  | 24 – 27            |
| Solidos solubles         | 10 – 16            |
| Fibra (seca)             | 11 – 16            |
|                          |                    |
| <b>En el jugo:</b>       |                    |
| Azucares                 |                    |
| - Sacarosa               | 75 – 92            |
| - Glucosa                | 70 – 88            |
| - Fructosa               | 2 – 4              |
| <b>Sales</b>             | 2 – 4              |
| - Inorgánicas            | 3.0 – 3.4          |
| - Orgánicas              | 1.5 – 4.5          |
| Ácidos orgánicos         | 1 – 3              |
| Aminoácidos              | 1.5 – 5.5          |
|                          |                    |
| <b>Otros no azucares</b> | 1.5 – 2.5          |
| - Proteínas              | 0.5 – 0.6          |
| - almidones              | 0.001 – 0.050      |
| - gomas                  | 0.3 – 0.6          |
| - ceras, grasas, etc.    | 0.15 – 0.50        |
| - Compuestos             | 0.10 – 0.80        |

**Fuente:** (Meade, G. P. y Chen, J. P, 1977)

En los tallos, el porcentaje se refiere a la planta de caña y en el jugo a sólidos solubles.

### **1.1.7. Usos del Jugo de Caña de Azúcar**

En los países que se cultiva, la caña se masca por el jugo dulce de sus fibras. El jugo se obtiene sometiendo la caña a presión mediante prensas trapiche, y se utiliza sobre todo para endulzar alimentos, pero se consume también como jugo fresco o fermentado. En el jugo espesado de caña, azúcar bruto, o azúcar bruto integral de caña. En los mercados existe azúcar blanca de cultivo ecológico sólo en pocas cantidades. (Naturland, 2000)

Varios productores ofrecen también melaza (jugo espesado de caña) y alcohol (subproducto del procesamiento de caña) de calidad ecológica. El alcohol ecológico se utiliza en la producción de cosméticos y medicamentos. (Naturland, 2000)

A continuación las formas de procesamiento más importante de la caña de azúcar:

Jugo de caña espesado y rápidamente cristalizado: Se produce sobre todo en pequeñas plantas industriales. Los cristales son irregulares y amorfos. La calidad del producto y su denominación comercial (rapaduro, mascobado, panela, chancaca) varía según su origen. El producto es de color marrón pardo, tiene un sabor a caramelo o a caña, más o menos fuerte, y por ello no es totalmente apto para endulzar alimentos y bebidas. (Naturland, 2000)

Azúcar centrifugado y cristalizado (azúcar bruto de caña): Se produce en plantas industriales. El azúcar bruto de caña se caracteriza por cristales bien formados y definidos y por su color gris parduzco o “blanco sucio”. Este azúcar ya no tiene sabor propio y es especialmente apropiado. (Naturland, 2000)

## **1.2. LEVADURAS**

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituídas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y 2 a más de 20  $\mu\text{m}$  de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. Algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos. (Carlile, 2001).

**Figura 1.** Envase contenido de *saccharum officinarum L.*



**Fuente:** Espinoza, 2015.

En general, las células de las levaduras son conidios formados según diferentes tipos de conidiogénesis. En *Saccharomyces* una célula madre da lugar a la formación de yemas en diferentes puntos de la superficie produciendo en cada uno sólo una célula hija (blastoconidio o blastospora), pero en *Rhodotorula* o *Cryptococcus* todos los brotes surgen desde un solo punto. La célula apiculada de *Saccharomyces* brota repetidamente de cada extremo, extendiéndose un poco con cada conidio formado. En el caso de *Schizosaccharomyces* la célula es casi cilíndrica y los conidios tienen una base muy ancha. Las levaduras hifales, como *Trichosporon* o *Geotrichum* producen artroconidios (o artrosporas) por formación de septos dobles en las hifas, que luego se escinden. (Kendrick B, 2000)

### **1.2.1. Clasificación**

Las levaduras son microorganismos que se encuentran clasificados dentro de los Ascomycetos y Basidiomicetos, no obstante las levaduras no forman un grupo muy definido, ya que no son una entidad taxonómica natural que guarde uniformidad morfológica. (Sarmiento A., Herrera J. , 2003).

## **1.2.2. Características Fisiológicas**

### **1.2.2.1. Temperatura**

La temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras está comprendida entre 5 y 37°C. El valor óptimo se sitúa hasta los 28°C. Sin embargo estas temperaturas no son rigurosamente las óptimas de crecimiento de las levaduras cuando se encuentran en sus ambientes naturales. (Villamil Y., Zapata Y., 1999)

Las levaduras que habitan la superficie de las hojas, están expuestas a temperaturas máximas que van de 40°C a 55°C bajo condiciones de luz intensa, y a temperaturas mínimas de 5°C a 10°C durante la noche. (Hiriano S. Upper C., 2000)

De modo general las levaduras no son microorganismos termofílicos, sin embargo la termodestrucción comienza desde los 52°C, siendo las células en la fase exponencial más sensibles que las células en la fase estacionaria. (Sarmiento A., Herrera J., 2003)

### **1.2.2.2. Oxígeno**

Todas las levaduras son aeróbicas, cuando el oxígeno está presente, éstas crecen eficientemente a partir de carbohidratos del medio para producir la biomasa y CO<sub>2</sub>. Sin embargo cuando no hay oxígeno o éste disminuye, las levaduras cambian a metabolismo anaerobio o fermentativo, que se traduce en la formación de menor cantidad de biomasa y producción de alcohol. (Sarmiento A., Herrera J., 2003)

El oxígeno también interviene en la síntesis de esteroides y del ácido nicotínico. Si estos compuestos están presentes en el medio, las levaduras pueden desarrollarse en anaerobiosis total. En el caso contrario para la supervivencia de las levaduras son necesario 0.0015 mg de oxígeno por gramo de biomasa para llevar a cabo la síntesis de los esteroides. (Sarmiento A., Herrera J., 2003).

### **1.2.2.3. pH**

El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras varía de 4,5 a 6,5 aunque muchas especies toleran grandes variaciones de pH 2.8 - 3 a 2 - 8,5. Entre estos, los valores del pH intracelular varía entre 5.8 a 6.8. (Villamil Y., Zapata Y., 1999)

Los ácidos orgánicos tienen efecto inhibitor en su forma disociada, el Ion  $H^+$  no penetra en la célula pero el ácido no disociado  $RCOOH$  puede hacerlo. La sensibilidad de una levadura a un ácido orgánico depende así del pH y de la capacidad de la levadura de metabolizar o eliminar el ácido si éste penetra la célula. Es por esto que los ácidos sórbico y propiónico son más inhibidores que los ácidos acéticos, cítricos y lácticos. (Sarmiento A., Herrera J. , 2003)

#### **1.2.2.4. Nutrientes**

Las levaduras para su crecimiento necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico. Algunas además necesitan de varias vitaminas (tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico, etc.) y otros factores de crecimiento. (Villamil Y., Zapata Y., 1999)

El carbono es el compuesto mayoritario de la célula de levadura: alrededor del 50% del peso seco; a su vez los compuestos carbonados son utilizados por las levaduras como fuente de carbono y energía. (Sarmiento A., Herrera J. , 2003)

Todas las levaduras utilizan la D-glucosa, la D-fructosa y la D-manosa. El carbono se puede suministrar en forma de azúcares, aldehídos, sales de algunos ácidos orgánicos, glicerina o etanol y ocasionalmente, en otra forma dependiendo del tipo de levadura. (Villamil Y., Zapata Y., 1999)

Entre las levaduras, la capacidad de utilizar ciertos compuestos carbonados varía; algunas pueden utilizar una amplia gama de compuestos pero otras asimilan solamente un número pequeño de ellos. Las fuentes de carbono como los glúcidos simples como las hexosas, los disacáridos y los trisacáridos son metabolizados por un gran número de levaduras. (Sarmiento A., Herrera J. , 2003)

Ninguna levadura es capaz de oxidar el metano; sin embargo varias especies de los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Torulopsis* pueden usar el metanol. (Sarmiento A., Herrera J. , 2003)

Todas las levaduras son capaces de utilizar nitrógeno en forma de ión amonio. Los iones amonio pueden ser aportados en el medio por el cloruro amónico, el nitrato amónico, el fosfato amónico, y sobre todo el sulfato amónico, que es el mejor

compuesto pues aporta al mismo tiempo el azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos. También se puede adicionar urea, peptona u otros derivados proteínicos solubles. (Villamil Y., Zapata Y., 1999)

### 1.3. *Saccharomyces boulardii* L.

*Saccharomyces boulardii* es una cepa de levadura tropical aislada por primera vez de las frutas del lichi y del mangostán en 1923 por el científico francés Henri Boulard. Está emparentada, pero es distinta del *Saccharomyces cerevisiae* en muchas de sus características taxonómicas, metabólicas y genéticas. (Malgoire JY, Bertout S, Renaud F, Bastide JM, Mallié M, 2005)

Boulard aisló la levadura después de haber observado a nativos del sureste de Asia, masticar la cáscara del lichi y del mangostán en su intento por controlar los síntomas del cólera.

*S. boulardii* ha mostrado ser no patógena, no sistémica (se mantiene dentro del tracto gastrointestinal en vez de propagarse a las demás zonas del organismo), y crece a una temperatura inusualmente alta de 37 °C. (McFarland L, Bernasconi P, 1993)

El nombre de *Saccharomyces* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar la masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Ariza, B. y Gonzalez, L. , 1997)

*Saccharomyces* pertenece al género de las levaduras de la familia Saccharomyetaceae; las células son esferoidales, elipsoidales o cilíndricas: La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales: los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies, pero presenta ausencia de hifas verdaderas. En presencia del O<sub>2</sub> las cepas pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato (Yepez, 1995)

*Saccharomyces boulardii* y otras especies de levaduras en general, realizan fermentación alcohólica, en la cual el etanol es formado a partir de la D-glucosa; éste azúcar es convertido en piruvato por la vía de Embden-Meyerhof Parnas en la cual el piruvato es descarboxilado a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y la tiamina pirofosfato y el acetaldehído reducido finalmente a etanol (Halasz, A. y Laszlity, R., 1991).

### **1.3.1. Clasificación Científica (Henri Boulard)**

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Saccharomyces*

Especie: *S. boulardii*

### **1.3.2. Requerimiento Nutricional**

*Saccharomyces boulardii* L. necesita de ciertas condiciones ambientales y sustentos, para su proporcionado desarrollo y proliferación. Algunos elementos básicos necesarios para cumplir con las condiciones son como el carbono, hidrogeno, nitrógeno, oxígeno y fosforo. (Ospina, A. y Palacios, M. , 1994).

**Figura 2.** *Sacharomyces boulardii*



**Fuente:** (Malgoire, Bertout, Renaud, Bastide, & Mallié, 2005)

#### **1.4. PROCESO DE FERMENTACIÓN**

La fermentación es un proceso catabólico (rompimiento de compuestos complejos a compuesto sencillos) oxidativo (intercambio de electrones) de cuyo resultado obtenemos un compuesto orgánico. El producto final varía según el sustrato.

En los seres vivos, la fermentación es un proceso anaeróbico donde no interviene el proceso de respiración celular. Son propias de los microorganismos, como las bacterias y las levaduras. (Serrano, 2009).

Con el pasar de los tiempos se han introducido diversos modelos de fermentación, proporcionando sistemas continuos y sistemas discontinuos.

##### **2.4.1. tipos De Fermentación**

###### **2.4.1.1. Fermentación Discontinua**

Una fermentación discontinua ("batch") puede ser considerada como un "sistema cerrado".

Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto:

- Oxígeno (en forma de aire)
- Un agente antiespumante
- Un ácido o una base para controlar el pH.

La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de los metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células, observándose las cuatro fases típicas de crecimiento:

- Fase de latencia
- Fase logarítmica
- Fase estacionaria
- Fase de muerte

En los procesos comerciales la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase Logarítmica o antes de que comience la fase de muerte. (Serrano, 2009)

#### **2.4.1.2. Fermentación Alimentada (*fed - batch*)**

Aquí los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios disminuye debido a la cantidad de glucosa que está en el medio (efecto glucosa), por esta razón en este tipo de fermentación los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio del proceso y continúan añadiéndose en pequeñas dosis durante la fase de producción. Este tipo de fermentación se utiliza en la producción de sustancias como la penicilina. (Serrano, 2009).

### **2.4.1.3. Fermentación Continúa**

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al tanque de fermentación (biorreactor) y una cantidad equivalente de la solución utilizada de los nutrientes con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema. El costo de producción de biomasa mediante cultivo continuo es menor si se compara al del cultivo discontinuo. Un ejemplo de metabolito obtenido mediante este tipo de fermentación los es una proteína de origen unicelular que se obtiene a partir de n-alcanos y almidones. Aunque muchas fermentaciones para la producción de metabolitos funcionan bien como procesos continuos, sólo unos pocos procesos han resultado útiles para la aplicación práctica por varias razones:

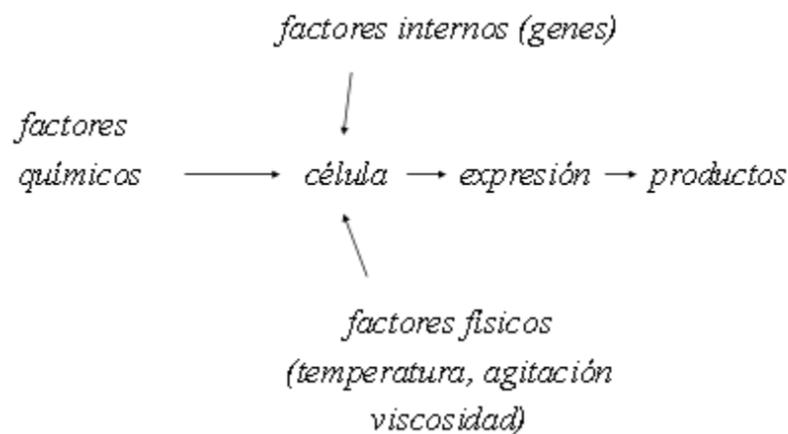
- A.** Muchos métodos de laboratorio operan continuamente durante sólo 20 a 200 horas; para que sea de utilidad industrial el sistema debe ser estable durante al menos 500 a 1,000 horas.
- B.** Es difícil mantener las condiciones estériles a escala industrial a lo largo de un largo período de tiempo.
- C.** La composición de los sustratos debe ser constante a fin de obtener una producción máxima. Sin embargo, la composición de las soluciones de nutrientes industriales son variables (líquido de maceración del maíz, peptona...) lo que puede originar cambios en la fisiología de la célula y disminuir la productividad.
- D.** Cuando se utilizan cepas de alto rendimiento se producen mutantes degenerados, los cuales pueden crecer en cultivo continuo más de prisa que las cepas de producción, dando lugar a que el rendimiento disminuya con el tiempo ya que cada vez son menos células las que sintetizan el producto de interés. (Serrano, 2009).

### **2.4.2. Factores que Regulan el Proceso de Fermentación**

Entre los factores que regulan el proceso de fermentación se encuentran los factores internos y los factores externos. Dentro de los factores internos observamos la genética del organismo y sus mecanismos de regulación metabólica. Estos elementos se pueden cambiar por medio de tratamientos físicos o químicos, los cuales alterarán la genética del organismo a través de mutaciones.

La mutación puede aumentar, disminuir o suprimir la producción de un metabolito. También mediante la ingeniería genética podemos cambiar este factor. Los factores externos son de naturaleza física y química. Dentro de los factores físicos importantes en el proceso de fermentación tenemos: la temperatura, la agitación y la aireación. En los factores de naturaleza química incluimos los componentes de los medios de fermentación, el oxígeno y los tanques de fermentación o bioreactores. Los factores químicos son importantes para el manejo de los factores externos ya que pueden influenciar la expresión celular. (Serrano, 2009).

**Figura 3.** Influencia de los factores externos sobre la presión celular



**Fuente:** (Serrano, 2009)

Hay algunos factores químicos que pueden ser negativos, por ejemplo algunos compuestos utilizados como nutrientes pueden causar que el producto final se afecte negativamente (glucosa). Si se utiliza glucosa constantemente en el medio no se produce la amilasa, ya que ésta actúa como un supresor catabólico. Si la glucosa se administra de forma controlada se puede expresar el gene y producir la proteína de interés. Otro ejemplo es del anión fosfato, éste debe estar a una concentración de entre 0.3 a 300 mM, produciéndose así un buen crecimiento. Sin embargo, si las concentraciones son mayores se suprimen la producción del producto de interés, que puede ser un antibiótico. También se ha observado que la presencia de azúcares asimilables cuando sobrepasan cierta concentración forman alcohol al cultivarse con *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es usada para producir pan. En este caso se debe utilizar la alimentación (fermentación) continua. (Serrano, 2009).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica I de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, la cual se encuentra localizada a 5 ½ kilómetros vía Pasaje en condiciones de temperatura de 22 °C - 32°C y humedad de 62-82%, con coordenadas: **Latitud:** 3°17'9.73"S. **Longitud:** 79°54'42.69"O. **Altitud:** 4 msnm.

**Figura 4.** Fotografía satelital de la Universidad Técnica de Machala



**Fuente:** Google Earth, 2014.

### 2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

#### 2.2.1. Investigación Descriptiva

En el presente trabajo investigativo se cuantificó la concentración de biomasa levaduriforme *Saccharomyces boulardii* L. formada en los bioreactores creados además de la determinación de etanol presente como sub producto de la fermentación.

### **2.2.2. Investigación Experimental**

Los resultados se obtuvieron mediante el análisis de las muestras tomadas de cada bioreactor los cuales tenían diferentes concentraciones de biomasa inicial, por el método de peso seco para la cuantificación de biomasa levaduriforme expresada en g/L. Para ello se empleó una solución salina.

## **2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **2.3.1. Población, Muestra y Selección de la Muestra**

Todo proceso analítico, depende de una óptima toma de muestras la cual es fundamental para los resultados. En esta fase se pueden realizar errores que invaliden parcial o totalmente dicho proceso. La toma de muestra del jugo de caña (*Saccharum officinarum* L.) se la debe realizar tras un proceso físico de extracción (molienda) del jugo, ya cuando la caña de azúcar ha alcanzado su estado adecuado de madurez (6 meses), se mide la temperatura del jugo de caña la misma que debe oscilar a la temperatura ambiente, la traslación al laboratorio se lo debe realizar evitando cambios de temperatura para así no tener una degradación del producto y envases herméticos para evitar la pérdida de muestra.

La muestra corresponde a jugo de caña la cual se la obtiene a partir de la caña de azúcar, mediante procesos físicos (molienda), térmicos (pasteurización), la cual será incorporada la levadura *Saccharomyces boulardii* L., para su crecimiento y reproducción.

### **2.3.2. Toma de Muestra**

La muestra fue tomada de los trapiches que se encuentran continuos de los sembríos de caña de azúcar de la parroquia Torata perteneciente al cantón Santa Rosa para las pruebas experimentales en la fermentación del jugo de caña, mediante la utilización de la levadura *Saccharomyces boulardii* L.

Luego fueron llevadas al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica I de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, para colocarlas en los respectivos bioreactores para su debida fermentacion con microorganismos.

## 2.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño de la investigación será de carácter descriptivo, describirá situaciones que se originen durante el proceso de fermentación discontinua y definiremos el tratamiento que resulte estadísticamente significativo en la producción de *Saccharomyces boulardii* L, en el aspecto experimental se realizará 4 tratamientos, correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar dos factores, concentración del jugo de caña y concentración del inóculo, dos niveles para el factor A y dos niveles para el factor B.

**Tabla 1.** Combinación del experimento

| CONCENTRACIÓN DEL<br>SUSTRATO (JUGO DE CAÑA) | CONCENTRACIÓN DE INÓCULO |              |
|--|--------------------------|--------------|
|  | B1 = 2 g/L               | B2 = 2,5 g/L |
| A = 20 °Brix                                 | A*B1                     | A*B2         |

**Fuente:** Espinoza, 2015.

### Tratamientos Resultantes

T1 = 20 °Brix; 2 g/L de Inóculo

T2 = 20 °Brix; 2,5 g/L de Inóculo.

## 2.5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.5.1. Preparación de los Biorreactores

Se utilizó recipientes de polipropileno de capacidad de 4 litros, al cual se le adaptó una válvula de media pulgada de diámetro y en la tapa se realizó un agujero de un centímetro de diámetro donde se colocó una manguera de plástico transparente que fue conectada a una trampa de agua (sale CO<sub>2</sub> y no entra oxígeno).

**Figura 5.** Diseño de biorreactor



**Fuente:** Espinoza, 2015

### **2.5.2. Preparación del Inóculo**

Se realizará un pre inóculo en Erlenmeyer con relación 1/5 de caldo melaza en el cual se inoculó una suspensión celular obtenida del banco de células de trabajo de *Saccharomyces boulardii* L, adicionando ampicilina con una concentración de (300 mg/L) (Pedroza, 2006). Y se incubó a temperatura ambiente, 150 rpm, durante 12 horas. Se realizó recuento inicial y final en placa y absorbancia (620 nm). Los muestreos fueron analizados por triplicado.

Este cultivo se utilizó para inocular dos Erlenmeyer con concentración de melaza al 20% (p/v) con relación 1/5, los cuales se dejaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se medirá la biomasa hasta obtener una absorbancia (620nm) de 1,0 diluyéndolo con solución salina estéril al 0.85% (p/v).

### **2.5.3. Fermentación Tipo Bach**

Para la fermentación en Erlenmeyer se guardara la relación 1/5 tomando 2 g/L de inóculo. Se adicionaron en Erlenmeyer con caldo melaza al 20 y 30 % (p/v) adicionando ampicilina (300 mg/L) a un pH inicial de 5.0. Los Erlenmeyer se incubaron a temperatura ambiente, 150 rpm, durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron muestreos cada 4 horas midiendo absorbancia (620nm) de biomasa y sustrato residual con previa hidrólisis de la sacarosa por triplicado.

Adicionalmente se verificó la viabilidad sembrando en superficie en placas de agar YPG adicionado de Cloramfenicol 0,1% (p/v) a la hora 0 y la hora 24.

## **2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **2.6.1. Cenizas (INEN. 0035:2012)**

La determinación de cenizas, es referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición o incineración completa de la materia orgánica de un alimento. La técnica que se utilizó en laboratorio, fue de cenizas en seco, la cual consistió en quemar las muestras en una mufla para eliminar toda la materia orgánica (Pearson, 1993).

#### **Procedimiento.**

- 1.- Introducir los crisoles en la estufa de secado a 100 ° C., por 10 minutos.
- 2.- Sacar los crisoles de la estufa con ayuda de pinzas y colocarlos rápidamente en el desecador por 3 minutos.
- 3.- Sacar los crisoles, colocarlos y pasarlos a la balanza analítica y anotar su peso.
- 4.- Pesar 2 g., de muestra de cada tratamiento y colocarla en los crisoles.
- 5.- Colocar los crisoles con las muestras en el interior de la mufla y dejarlas durante 24 horas a una temperatura de entre 500 y 600 ° C.
- 6.- Sacar los crisoles de la mufla con ayuda de pinzas y colocarlos en la estufa a 100 ° C., durante 10 minutos.
- 7.- Colocarlos en la desecadora por 3 minutos y pesar.
- 8.- Expresión de resultados:

**Cálculos:**

**Dónde:**

P= peso de la muestra, en gramos.

P1= peso del crisol

P2= peso del crisol más cenizas, en gramos.

### **2.6.2. Porcentaje de Humedad (INEN 0777:1985)**

Determinar la cantidad de agua presente en un alimento utilizando los métodos de estufa de aire, vacío y termo balanza.

La determinación de humedad es uno de los análisis más importantes a realizar en un producto alimenticio y aún uno de los más difíciles, si queremos obtener datos con una gran exactitud y precisión.

La determinación de materia seca es la pérdida de humedad que sufre un alimento cuando se somete a una combinación tiempo – temperatura adecuada, y el residuo que se obtiene, se conoce como sólidos totales o materia seca (Pearson, 1993).

**Procedimiento.** Pesaje de charolas de aluminio vacías.

- 1.-Colocar las charolas dentro de la estufa de secado, a una temperatura de 100 ° C., por 10 min.
- 2.-Sacar las charolas con ayuda de pinzas y colocarlas en un desecador que contiene pentóxido de fósforo, que es una sustancia secante, por 3 minutos.
- 3.-Sacar las charolas con las pinzas, colocar de manera independiente cada una en la balanza analítica y pesarlas.
- 4.-Poner un papel encerado dentro de la balanza y colocar 2 g., de muestra de cada tratamiento.

5.-Colocar las charolas con cada muestra en la estufa de secado a una temperatura de 55 ° C., por 36 horas o hasta que la muestra esté completamente seca.

6.-Sacar las charolas con las muestras de la estufa de secado y colocarlas en la estufa a 100 ° C., por 10 minutos y después al desecador por 3 minutos y pesar en la balanza analítica.

7.- Expresión de resultados: se determinó la materia seca –M.S.- por diferencia de pesos y por consiguiente el porcentaje de humedad.

Peso de la charola con la muestra después de 24 horas a 100 ° C. menos el peso de la charola vacía = M. S.

100% - Materia Seca = a humedad

### **2.6.3. Determinación de °Brix (NMX-F-436-SCFI-2011)**

Se basa en el índice de refracción de soluciones que contengan principalmente sacarosa. Este índice, es una medida exacta de la concentración de sustancia disuelta en soluciones que contengan principalmente sacarosa (Turégano, 2011).

Sistema de medición específico, en el cual el ° Brix, representa el porcentaje en peso de sacarosa pura en solución. En la industria azucarera se le considera como el porcentaje de sólidos disueltos y en suspensión, en las soluciones impuras de azúcar (Turégano, 2011)

#### **Procedimiento:**

1.-De ser necesario, colar la muestra de la solución que contenga principalmente sacarosa.

**NOTA 1:** En caso de muestras con alta densidad, se deben diluir con agua y la lectura refractométrica debe multiplicarse por el factor de dilución.

2.- Enjuagar el prisma con agua.

3.- Tomar una gota de la solución y colocarla en el refractómetro.

4.- Observar la escala del refractómetro y anotar la lectura indicada.

**NOTA 2:** La temperatura se corrige automáticamente, de acuerdo con el refractómetro. La limpieza del equipo debe hacerse atendiendo el instructivo del mismo.

### **Expresión de Resultados**

La lectura indicada por el refractómetro es igual al ° Brix de la muestra.

#### **2.6.4. Determinación del pH (NMX-F-317-S-1978)**

El método a que esta Norma se refiere, se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro) (Laboratorio Nacional de Salubridad., 1978).

### **Preparación de la Muestra**

Los productos alimenticios podrán consistir de un líquido, una mezcla de líquido y sólido, los que pueden diferir en acidez. Otros productos alimenticios podrán ser semisólidos o de carácter sólido. Las siguientes preparaciones para examinar pH se recomiendan para cubrir esta situación (Laboratorio Nacional de Salubridad., 1978)

- 1.- Productos líquidos Mezclar cuidadosamente la muestra hasta su homogeneización.
- 2.- Ajustar la temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y determinar su pH.

### **Procedimiento**

- 1.- Calibrar el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, pH 7 y pH 10 según la acidez del producto.
- 2.- Tomar una porción de la muestra ya preparada, mezclarla bien por medio de un agitador y ajustar su temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .
- 3.- Sumergir él (los) electrodo (s) en la muestra de manera que los cubra perfectamente. Hacer la medición del pH. Sacar el (los) electrodo (s) y lavarlos (s) con agua.

### **Expresión del Resultado**

El valor del pH de la muestra se lee directamente en la escala del potenciómetro.

### **2.6.5. Determinación del Oxígeno Disuelto (NMX-AA-012-SCFI-2001)**

En el método electrométrico los electrodos de membrana sensible al oxígeno, ya sean galvánicos o polarizados están constituidos por dos electrodos de metal en contacto con un electrolito soporte, separado de la disolución de muestra por medio de una membrana selectiva. En el cátodo, que usualmente es oro o platino, ocurre la reducción del oxígeno mientras que en el ánodo ocurre la oxidación del metal (plata o plomo). La diferencia básica entre el sistema galvánico y el polarizado es que en el primero la reacción en el electrodo ocurre espontáneamente, mientras que en el segundo es necesario aplicar un potencial externo para polarizar el electrodo indicador. Generalmente se utilizan membranas de polietileno y fluorocarbón que son permeables al oxígeno molecular y relativamente rugosas (Aguilar, 2001)

#### **Procedimiento**

1.- Posterior a la calibración del instrumento proceder a hacer la medición de la(s) muestra(s) siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

1.1.- Introducir el electrodo previamente lavado con agua a la muestra.

1.2.- Agitar uniformemente y leer directamente del instrumento la concentración de oxígeno.

#### **Cálculos**

Las concentraciones de OD se toman directamente de la lectura del instrumento.

### **2.6.6. Determinación de la Conductividad (NMX-AA-093-SCFI-2000)**

La cantidad de moléculas que se han disociado depende de la concentración de la solución. Las soluciones, al igual que los conductores metálicos obedecen a la Ley de Ohm, excepto en voltajes muy elevados y corrientes de frecuencia muy alta (Quintanilla, 2000)

## **Procedimiento**

### 1.- Medición de la conductividad

1.1.- Preparar el equipo para su uso de acuerdo a las instrucciones del fabricante y seleccionar un electrodo con la constante de celda apropiada para el intervalo de medición en que se usará.

1.2.- La cantidad de la muestra depende del equipo por usar.

1.3 Las muestras y la disolución de calibración deben estar a 25°C de preferencia o a la temperatura ambiente.

1.4.- Determinar la temperatura de la muestra.

1.5.- Enjuagar la celda con porciones de la disolución de prueba antes de realizar la medición para evitar contaminación de la muestra por electrolitos.

1.6.- Sumergir la celda en la disolución de prueba, el nivel de la disolución debe cubrir los orificios de ventilación de la celda, agitar la celda verticalmente para expulsar las burbujas de aire.

1.7.- Seleccionar el rango adecuado de medición en el instrumento, una vez que se estabilice la lectura, anotar el valor de conductividad.

1.8.- Después de cada determinación, retirar la celda de la disolución y enjuagarla con agua desionizada. 10.1.9 Reportar los resultados como conductancia específica o conductividad, mS/m a 25°C.

### **2.6.7. Determinación de Azúcares Reductores Totales**

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo está compuesto por sacarosa, se hizo necesario realizar hidrólisis ácida previa a la cuantificación de azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

### **2.6.7.1. Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)**

Después de la etapa de hidrólisis, se procedió con el protocolo para llevar a cabo la técnica de determinación de azúcares reductores por el método de DNS para lo cual a 0.25 ml de la solución hidrolizada se agregaron 0.25 ml del reactivo DNS, los tubos fueron calentados en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, se frenó la reacción con hielo. Se adicionaron 2.5ml de agua destilada, se agitó en vórtex y se realizó la lectura de densidad óptica (D.O) a 540 nm para cada tubo (Miller, 1959).

A partir de cada una de las soluciones hidrolizadas de sacarosa y en tubos protegidos por la luz, se procede con el siguiente protocolo:

- Se toman 0,25mL de la solución hidrolizada de sacarosa y 0,25mL del blanco y se le adiciona a cada uno de los tubos 0,25mL del reactivo DNS.
- Agitar los tubos en vórtex.
- Llevar a ebullición a 92°C durante 5 minutos.
- Frenar la reacción con hielo durante 5 minutos.
- Adicionar 2,5mL de agua destilada a cada uno de los tubos.
- Realizar determinaciones de absorbancia (540nm) ajustando el 0 de absorbancia con el blanco de la prueba.

## **2.7. DETERMINACIÓN DE BIOMASA**

La biomasa se determinara mediante la técnica de peso seco, la cual se realizara previamente. Para llevar a cabo la lectura de la biomasa obtenida en las curvas de crecimiento se realizaron tres lavados con solución salina estéril al 0,85% (p/v), con el fin de retirar cualquier interferente proveniente de la melaza de caña que pudiera afectar en la lectura en espectrofotómetro a 620 nm.

Además, se verificó la viabilidad de la cepa por medio de recuentos en placa en agar YPG al inicio y al final de cada fermentación tanto en Erlenmeyer como en biorreactor.

## **2.8. RECURSOS EMPLEADOS**

### **2.8.1. Recursos Humanos**

- Investigador
- Ayudante
- Tutor

### **2.8.2. Recursos Físicos**

Para la obtención de la biomasa levaduriforme se utilizaron los siguientes materiales: jugo de caña, levaduras *Saccharomyces boulardii* L dela marca comercial FLORATIL, cloruro de sodio y agua destilada y bi destilada.

### **2.8.3. Materiales**

- Mascarilla
- Gorro
- Guantes
- Fundas de polietileno con cierre hermético
- Toallas absorbentes
- Tijera
- Cinta adhesiva de papel
- Papel filtro
- Espátula
- Bioreactores de 4L

### **2.8.4. Material de Laboratorio**

- Balones volumétricos 50ml, 100ml, 250ml, 500ml
- Pipetas volumétricas 1ml, 10ml
- Pipetas automática 100-1000µl
- Vasos de precipitación 50ml, 100ml, 250ml
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Crisoles 30 mm

- Cápsulas de porcelana 120 mm
- Embudo filtrado rápido de 60 mm
- Desecador
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Pipetas volumétricas 10 ml
- Bureta de 25 ml
- Micro pipetas 1000 µl
- Frascos ámbar de polietileno de 60ml, 100ml, 1000ml.
- Cubetas o blísteres 10 ml

#### **2.8.5. Equipos**

- Balanza semi analítica ZHIMADZU
- Baño María
- Estufa
- Fuente de alimentación Extech modelo 382202
- GPS colorado 300 Garmin
- Multiparametro (pH/ISE/CONDUCTIVIDAD/DO) TIPO ORION STAR A329 digital (A.O.A.C. 32.016).
- Brixometro
- Espectrofotómetro HACH DR 3900
- Baño de agua marca Boeco
- Estufa marca Boeco
- Mufla marca Boeco
- Agitador magnético marca Boeco

#### **2.8.6. Reactivos**

- Levaduras (*Saccharomyces boulardii* L)
- Jugo de caña (*Saccharum officinarum* L.)
- Ácido Sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M
- Ácido Nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>)
- HNO<sub>3</sub> 5%
- Ácido Clorhídrico concentrado (HCl)

- HCl 0.5M
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) (0.85% en peso)
- Agua des ionizada

#### **2.8.7. Varios**

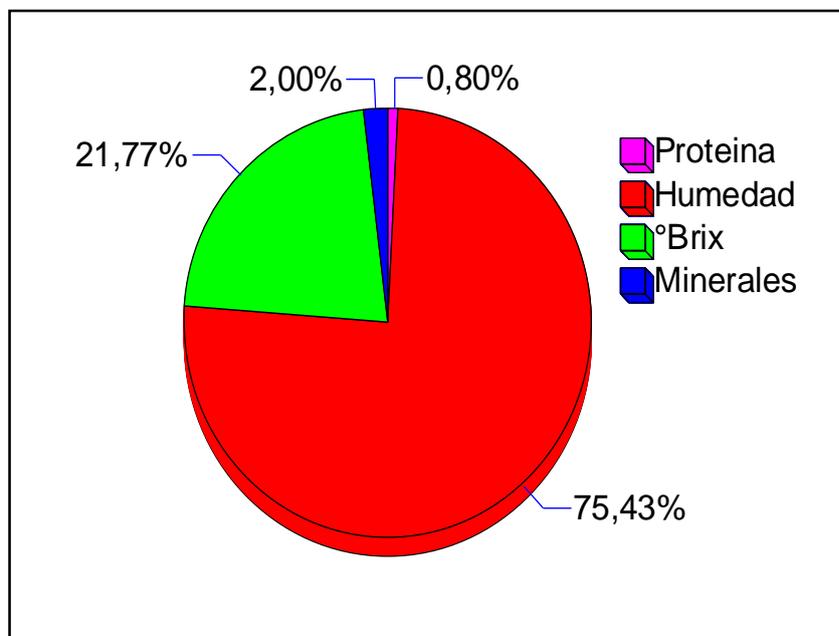
- Hojas de papel bond
- Computador portable Acer
- Impresora HP - 4780
- Bolígrafos

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL JUGO DE CAÑA DE AZÚCAR

El análisis físico-químico implica la caracterización de jugo de caña, haciéndose énfasis en la determinación de su composición química, es decir determinar que sustancias están presentes (proteínas, grasas, humedad, vitaminas, minerales, carbohidratos, antioxidantes, etc.) y en qué cantidades se encuentran (Zumbado, 2005).

**Figura 6.** Composición química de jugo de caña de azúcar



**Fuente:** Espinoza, 2015.

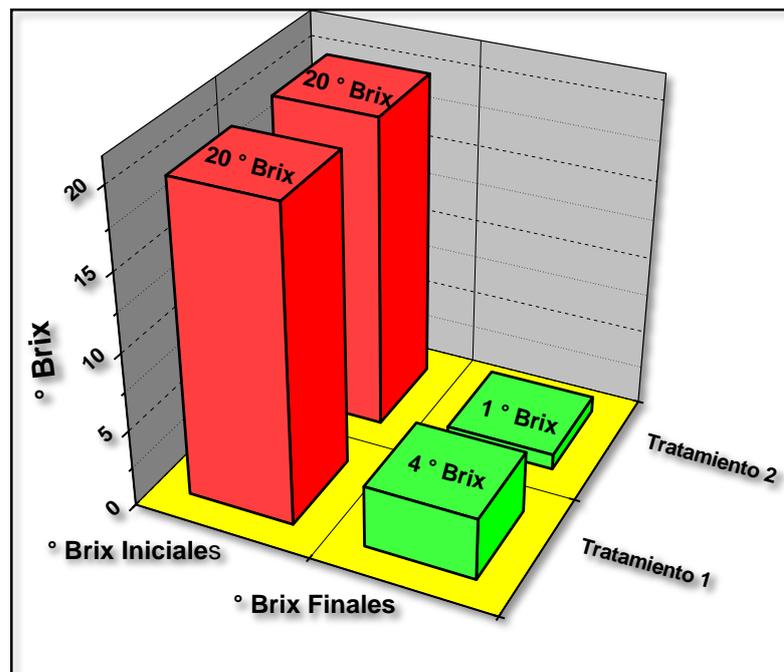
Como se puede apreciar en la figura 3 existe una concentración significativa de sólidos solubles (°Brix) los cuales fueron los que sirvieron como sustrato para el crecimiento y reproducción de la levadura *Saccharomyces boulardi* L, dentro de las características físicas se puede citar que el jugo utilizado tuvo una densidad de 1,025 g/mL, lo cual facilita la movilidad de las levaduras por todo el medio de cultivo.

### 3.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA LEVADURIFORME.

La producción de biomasa o proteína unicelular a partir de levaduras como *Saccharomyces boulardii*, cultivadas en medios de cultivo específicos (jugo de caña de azúcar) y en condiciones fermentativas adecuadas resulta una alternativa viable para el crecimiento y reproducción de este microorganismo (Chacón, 2004; Carrillo, Aguilar, Wong, & Muñiz, 2010).

A continuación en la figura 4 se muestra la evaluación del crecimiento de *Saccharomyces boulardii*, en función del consumo de los azúcares (Brix) presentes en el medio de cultivo.

**Figura 7.** Consumo de sólidos solubles (°Brix) durante el proceso de fermentación



**Fuentes:** Espinoza, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 4 una vez inoculado el microorganismo en el medio de cultivo, la concentración de azúcares presentes en el jugo de caña comienza a disminuir, lo cual indica que la levadura ha comenzado a consumir este sustrato, en el tratamiento 1 (2 g/L Inóculo) la concentración de sólidos solubles (°Brix) disminuye 16 °Brix mientras que en el tratamiento 2 (2,5 g/L Inóculo) disminuye 19 °Brix, demostrando este tratamiento tener mayor eficiencia, en análisis de varianza realizado al

experimento en función de la disminución de los °Brix del medio de cultivo de muestra que si existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los dos tratamientos estudiados. A continuación en la tabla 4 se muestra el análisis de varianza del experimento.

**Tabla 1.** Análisis de varianza del experimento

| <b>FUENTE</b>  | <b>MEDIA</b> | <b>VARIANZA</b> | <b>N</b> |
|----------------|--------------|-----------------|----------|
| T1 = 2 g/L     | 16,09        | 0,28949         | 4        |
| T2 = 2,5 g/L   | 19,06        | 0,33229         | 4        |
| F = 56,87377   |              |                 |          |
| p = 2,81893E-4 |              |                 |          |

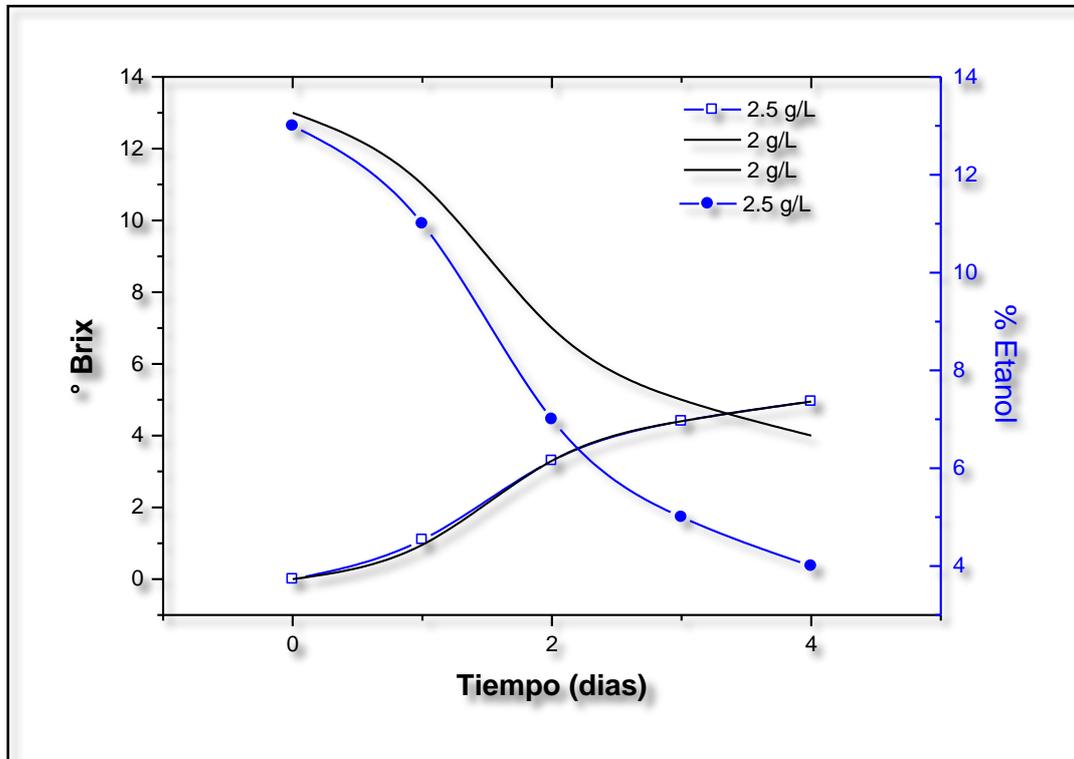
**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como podemos apreciar en la tabla dos si existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los dos tratamientos estudiados, existiendo una diferencia entre medias de 3 °Brix.

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS (°BRIX, pH, TEMPERATURA, OXÍGENO DISUELTO, CONDUCTIVIDAD, AZUCARES REDUCTORES, °GL)**

La medición de los parámetros fisicoquímicos fue realizada con la finalidad de controlar que se estaba llevando a cabo la reacción con normalidad y determinar el tiempo de fermentación. A continuación en la figura 5 se muestran los resultados de la disminución de los °Brix presentes en el medio de cultivo y el incremento de la concentración de etanol.

**Figura 8.** Variación de los grados Brix en relación al porcentaje de etanol producido

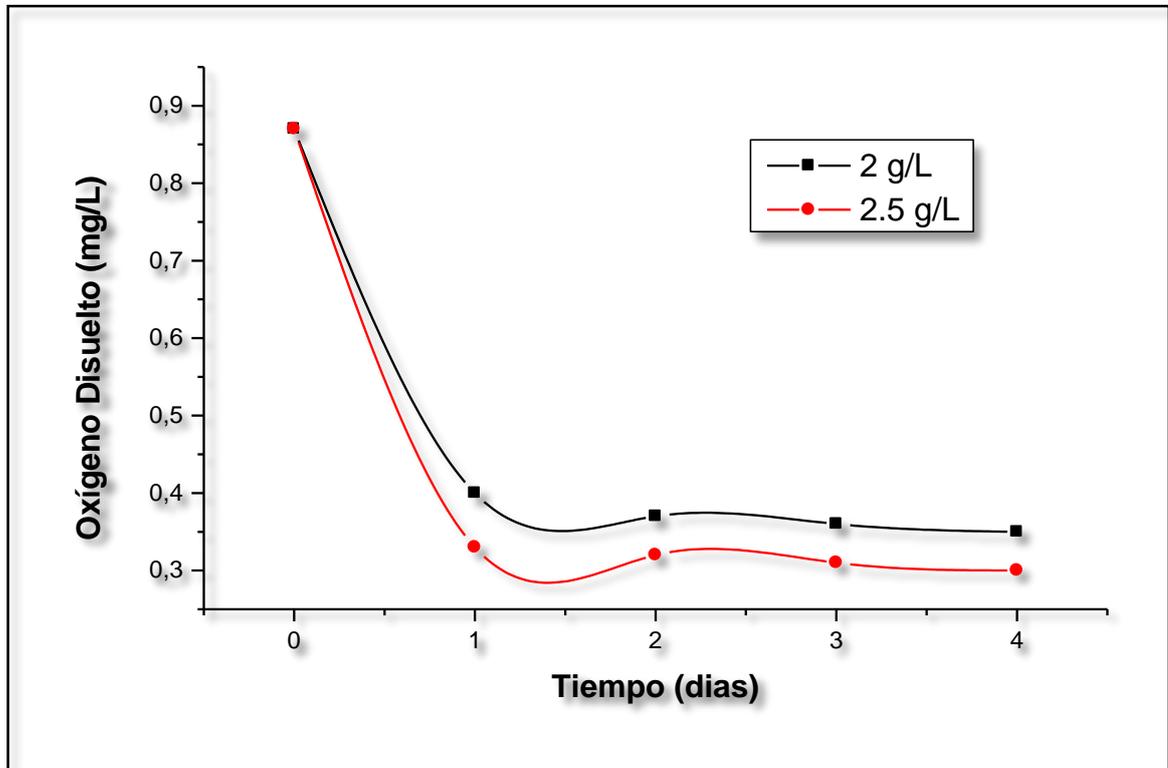


**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como podemos apreciar en la figura 5, existe una disminución constante de los azúcares (°Brix) y un incremento similar en la concentración de etanol (°GL) durante los cuatro días de fermentación anaerobia del jugo de caña de azúcar.

A continuación en la figura 6 se muestra la disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

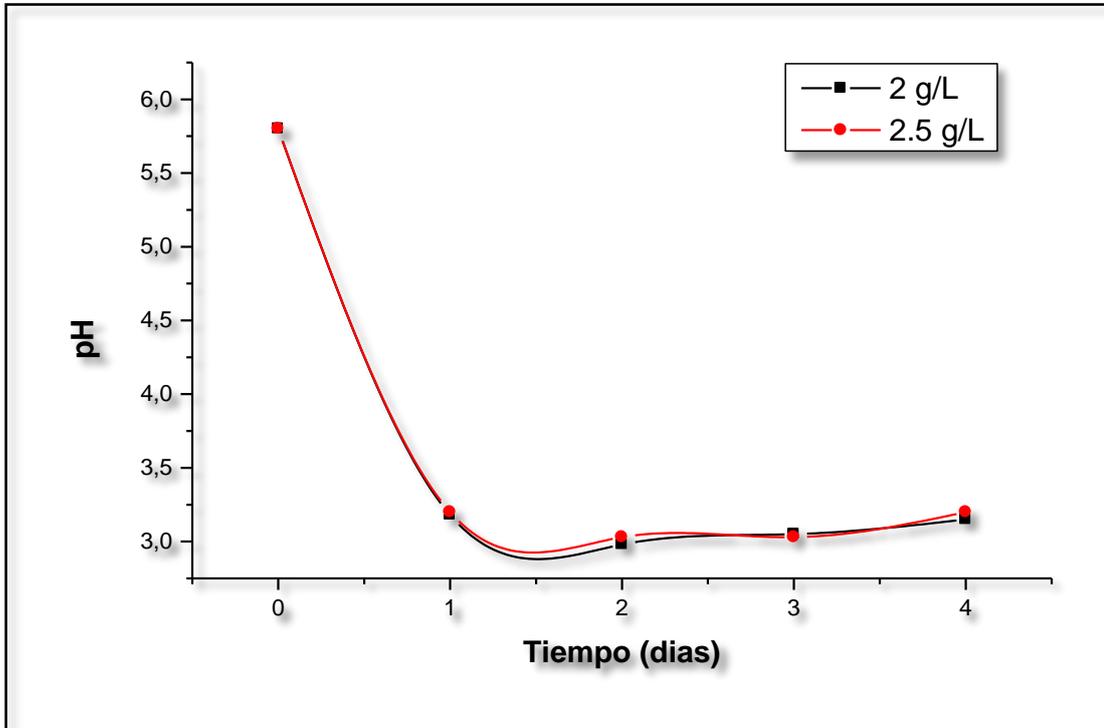
**Figura 9.** Variación de la concentración de oxígeno disuelto



**Fuente:** Espinoza, 2015.

La disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es un indicador que las levaduras han comenzado a consumirlo para poder producir biomasa y generalmente para producir etanol (Owen, 1991). A continuación en la figura 7 se muestran los resultados de la disminución del valor de pH del medio de cultivo.

**Figura 10.** Variación del pH en la fermentación

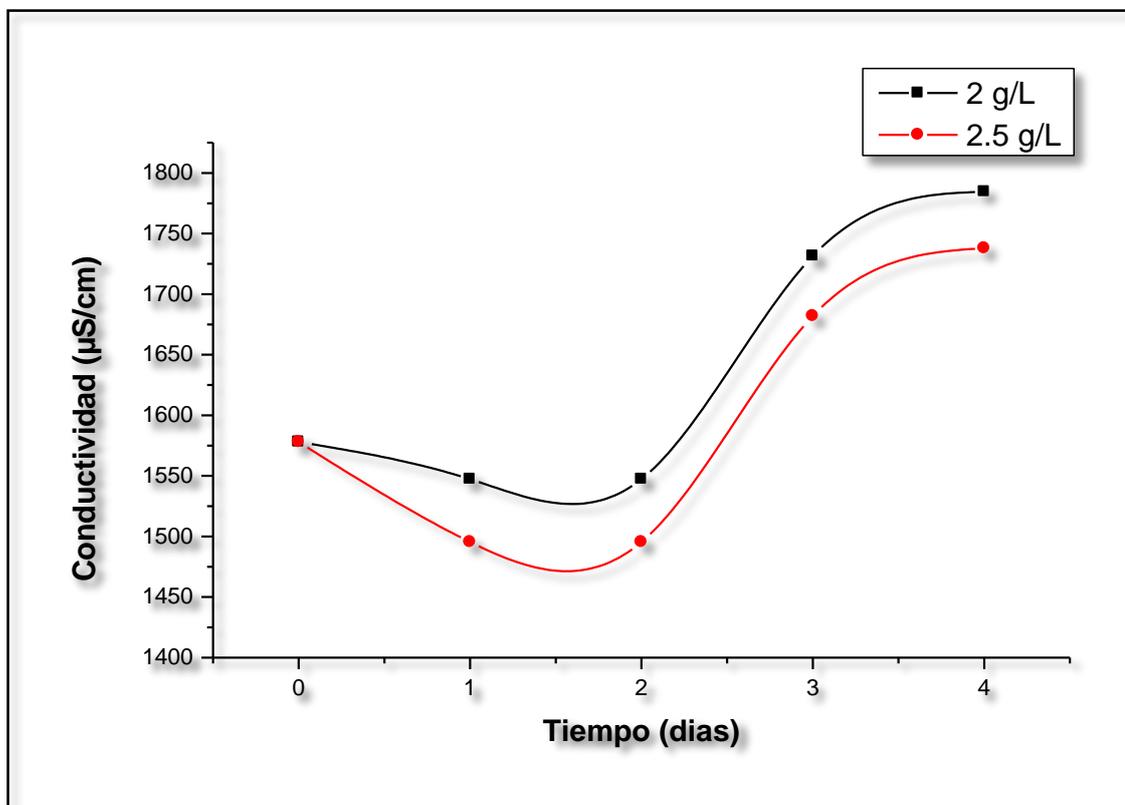


**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como podemos apreciar en la figura 7 existe una disminución acelerada en el pH del medio de cultivo, tal es el caso que en los dos tratamientos esta disminuye desde 5,8 a 3,2, lo cual se le atribuye a la producción de  $\text{CO}_2$  en el medio de cultivo, lo cual es producto de la respiración celular de la levadura.

A continuación en la figura 8 se muestra la variación que experimenta la conductividad eléctrica del medio de cultivo.

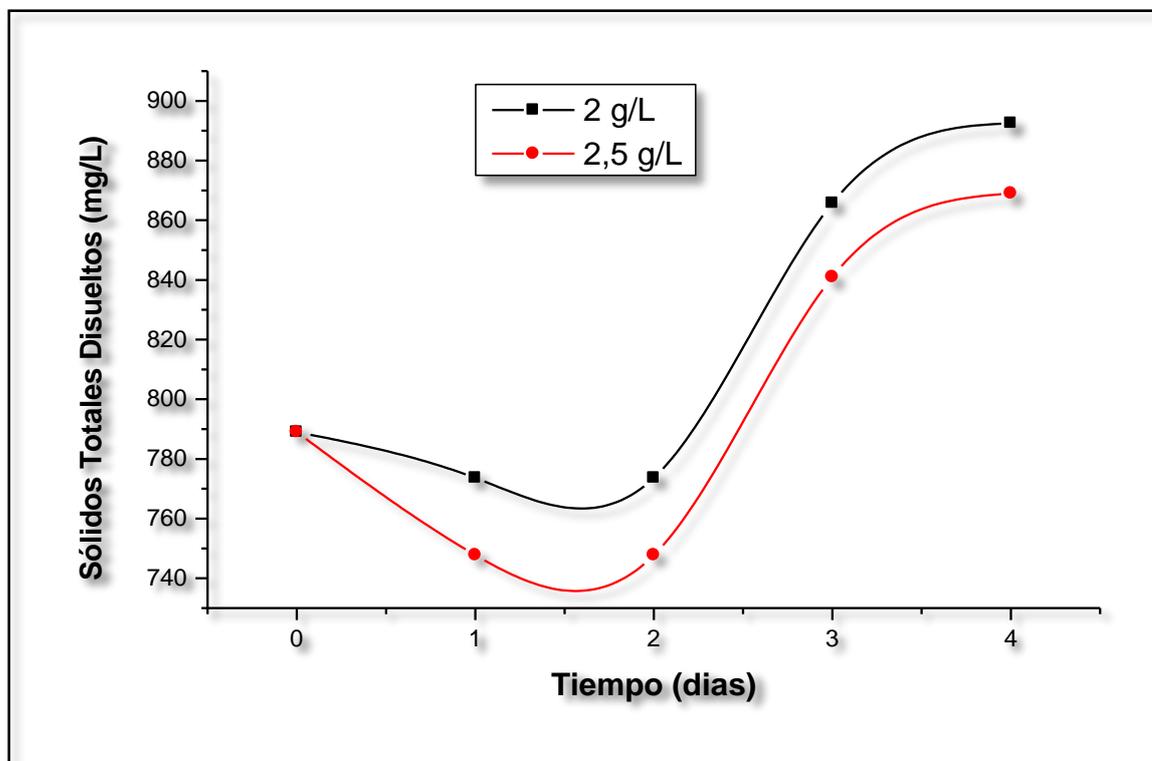
**Figura 11.** Comportamiento de la conductividad durante la fermentación



**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 8 existe un incremento significativo en la conductividad eléctrica del medio, la cual es un indicador del aumento de sólidos totales disueltos y por ende la biotransformación de los azúcares en alcohol y producción de biomasa. A continuación en la figura 9 se muestra el incremento de la concentración de sólidos totales disueltos (mg/L) en el fermentado de jugo de caña de azúcar.

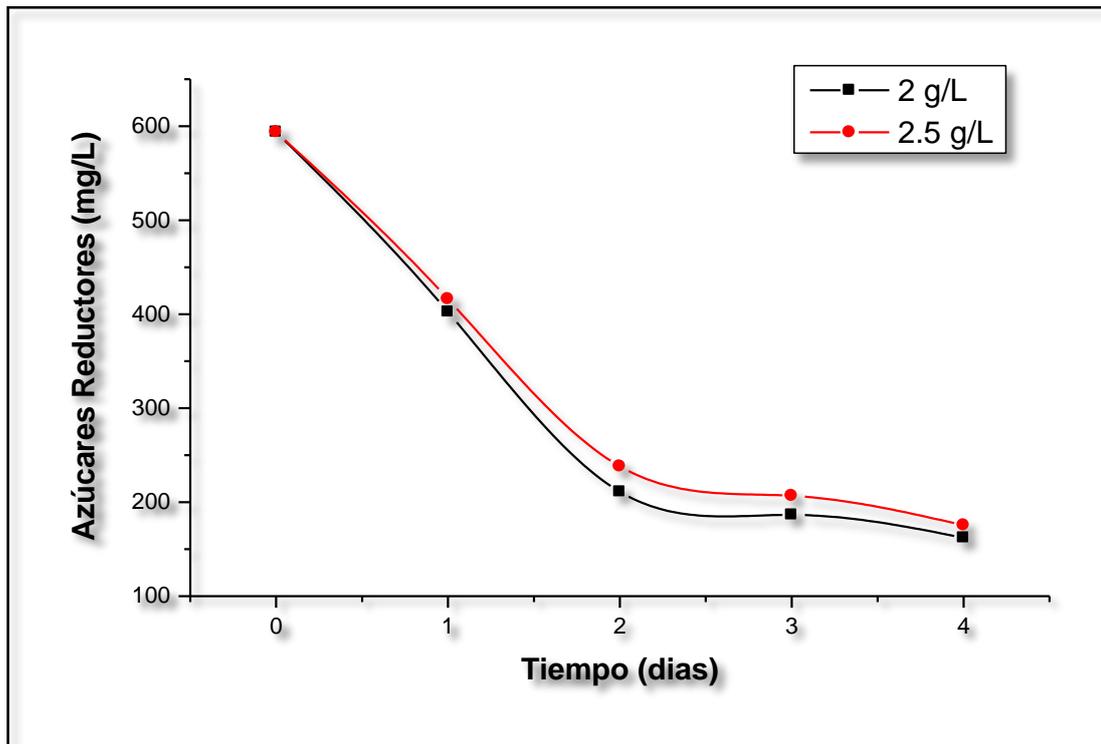
**Figura 12.** Comportamiento de las distintas concentraciones de los sólidos disueltos totales en el proceso fermentativo



**Fuente:** Espinoza, 2015.

Se puede ver en la figura 9 la concentración de solidos totales disueltos aumenta en el tratamiento 1 de 790 mg/L a 890 mg/L y en el tratamiento 2 de 890 mg/L a 870 mg/L, existiendo una diferencia significativa de 20 mg/L entre los dos tratamientos. A continuación en la figura 10 se muestra la disminución de los azucares reductores de los dos tratamientos estudiados.

**Figura 13.** Disminución de azúcares reductores en el proceso fermentativo



**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 10 existe una disminución acelerada de la concentración de azúcares reductores lo cual indica que se ha producido etanol, CO<sub>2</sub> y biomasa (Owen, 1991).

### **3.3.1. Caracterización Cromatografía del Fermentado de Jugo de Caña.**

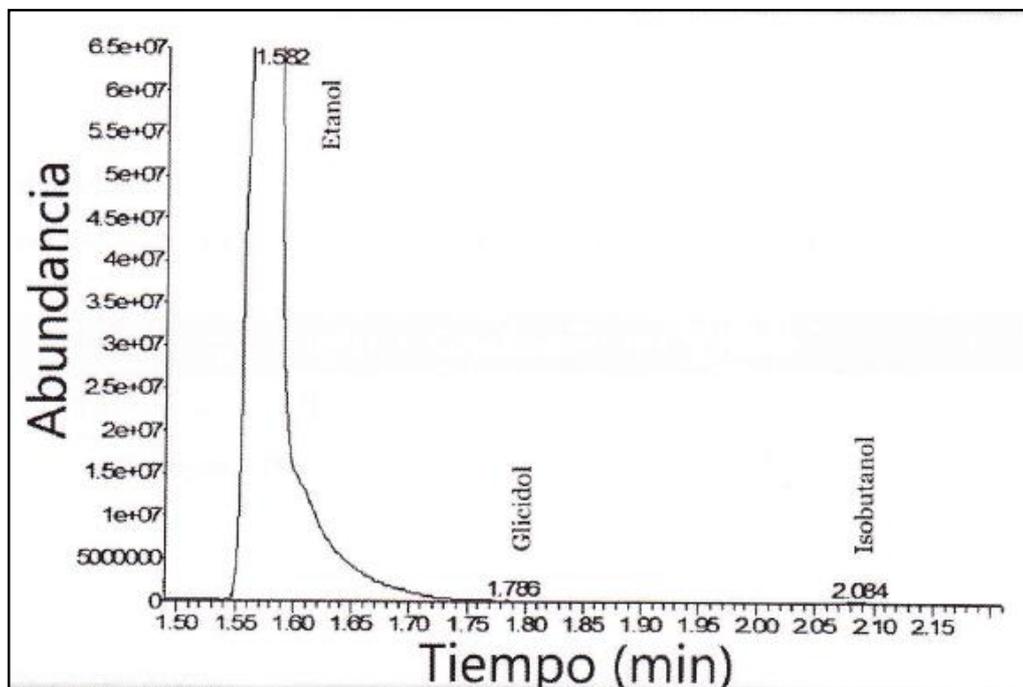
Este procedimiento se lo realizó para determinar si existe la presencia de compuestos tóxicos en el fermentado, tales alcoholes primarios (metanol). A continuación en la tabla 3 se presentan los compuestos identificados de la muestra analizada mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

**Tabla 2.** Compuestos identificados en el fermentado de jugo de caña

| Tiempo de retención (min) | Compuesto  | %    |
|---------------------------|------------|------|
| 1,582                     | Etanol     | 8    |
| 1,786                     | Glicerol   | 0,21 |
| 2,082                     | Isobutanol | 0,01 |

Fuente: CIBE-ESPOL, 2015.

**Figura 14.** Cromatograma del fermentado de jugo de caña de azúcar utilizando levadura *Saccharomyces boulardii*



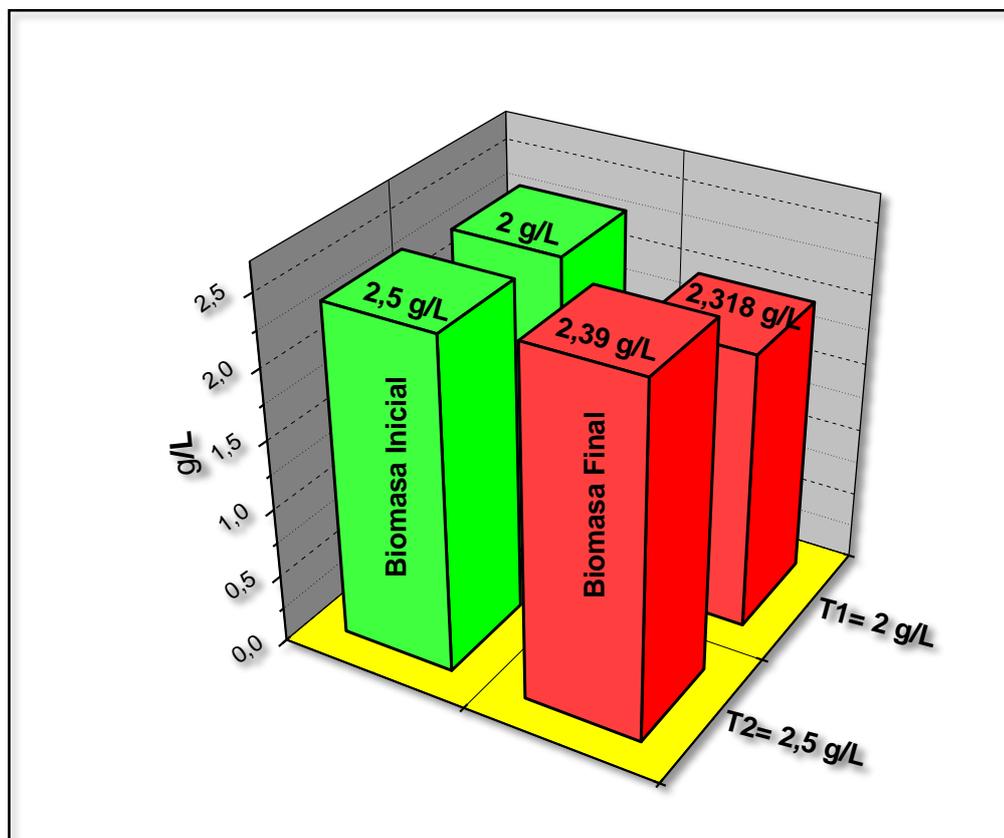
Fuente: CIBE-ESPOL, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 12, el componente mayoritario, presente en el fermentado de jugo de caña de azúcar vino es el etanol en una concentración del 10,22 % v/v, mientras que el glicerol 0,21 % y el isobutanol en un 0,01%, lo cual demuestra que en el fermentado, el metabolito presente en mayor concentración es etanol.

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE BIOMASA PRODUCIDA A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DEL JUGO DE CAÑA.

Se conoce bastante respecto al crecimiento de levaduras en medios ricos en azúcares (como melazas de caña), en donde los niveles de oxígeno disuelto y de azúcares en el medio regulan el metabolismo celular de manera que se produzca exclusivamente masa celular y dióxido de carbono o, por al contrario, se minimice la producción de biomasa y se favorezca la producción de metabolitos, como por ejemplo el etanol.

**Figura 15.** Producción de biomasa durante los 4 días de fermentación alcohólica



**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como podemos ver en la figura 13 la producción de biomasa es reducida, lo cual mediante el análisis de varianza se pudo establecer que no existe diferencia significativa en la producción de biomasa, debido a que a concentraciones mayores de 2 g/L de biomasa y al existir una reducida cantidad de nutrientes no es posible el crecimiento significativo de microorganismos. A continuación en la tabla 3 se muestra el análisis de varianza aplicado al experimento.

**Tabla 3.** Análisis de varianza del experimento

| <b>Fuente</b> | <b>Media</b> | <b>Varianza</b> | <b>N</b> |
|---------------|--------------|-----------------|----------|
| A             | 2,31         | 0,0441          | 3        |
| B             | 2,39         | 0,0081          | 3        |
| F = 0,36782   |              |                 |          |
| p = 0,57693   |              |                 |          |

**Fuente:** Espinoza, 2015.

Como nos indica la tabla 3 no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la producción de biomasa (*Saccharomyces boulardii* L).

## 4. CONCLUSIONES

- Se ha determinado que el jugo de caña contiene una concentración significativa de sólidos solubles (°Brix) los cuales fueron los que sirvieron como sustrato para el crecimiento y reproducción de la levadura *Saccharomyces boulardii*, dentro de las características físicas se puede citar que el jugo utilizado tuvo una densidad de 1,025 g/mL, lo cual facilita la movilidad de las levaduras por todo el medio de cultivo.
- La evaluación del crecimiento de la levadura, nos indica que una vez inoculado el microorganismo en el medio de cultivo, la concentración de azúcares presentes en el jugo de caña comienza a disminuir, lo cual indica que la levadura ha comenzado a consumir este sustrato, en el tratamiento 1 (2 g/L Inóculo) la concentración de sólidos solubles (°Brix) disminuye 16 °Brix mientras que en el tratamiento 2 (2,5 g/L Inóculo) disminuye 19 °Brix, demostrando este tratamiento tener mayor eficiencia, en análisis de varianza realizado al experimento en función de la disminución de los °Brix del medio de cultivo de muestra que si existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los dos tratamientos estudiados.
- El monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de la fermentación anaerobia, nos indica que existe una disminución constante de los azúcares (°Brix) y un incremento similar en la concentración de etanol (°GL) durante los cuatro días de fermentación anaerobia del jugo de caña de azúcar. La disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo es un indicador que las levaduras han comenzado a consumirlo para poder producir biomasa y generalmente para producir etanol (Owen, 1991).

El valor de pH del medio de cultivo sufre una disminución acelerada, tal es el caso que en los dos tratamientos esta disminuye desde 5,8 a 3,2, lo cual se le atribuye a la producción de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo, lo cual es producto de la respiración celular de la levadura.

- La concentración de sólidos totales disueltos aumenta en el tratamiento 1 de 790 mg/L a 890 mg/L y en el tratamiento 2 de 890 mg/L a 870 mg/L, existiendo una diferencia significativa de 20 mg/L entre los dos tratamientos.

Los azúcares reductores experimentan una disminución acelerada de la concentración de lo cual indica que se ha producido etanol, CO<sub>2</sub> y biomasa (Owen, 1991).

- El análisis de la determinación de etanol mediante cromatografía de gases indica que el componente mayoritario, presente en el fermentado de jugo de caña de azúcar es el etanol en una concentración del 10,22 % v/v, mientras que el glicerol 0,21 % y el isobutanol en un 0,01%, lo cual demuestra que en el fermentado el metabolito presente en mayor concentración es etanol.
- Se determinó que el jugo de caña no sirve como un sustrato idóneo para la producción de biomasa, mediante el análisis de varianza se pudo establecer que no existe diferencia significativa en la producción de biomasa, debido a que a concentraciones mayores de 2.5 g/L de biomasa tiende a disminuir por existir una reducida cantidad de nutrientes, no es posible el crecimiento significativo de microorganismos.

## 5. RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones se plantea evaluar el medio jugo de caña adicionando fuentes de nitrógeno como fosfato de amonio, y de esta forma enriquecer el medio con nitrógeno
- Evaluar la producción de biomasa (*Saccharomyces boulardii* L.) en condiciones aerobias, e incorporando oxígeno de manera artificial.
- Utilizar cultivos puros para la producción de biomasa, caso contrario existirá la formación de otros metabolitos indeseados.
- Los bioreactores deben brindar las condiciones necesarias para la toma de muestra para monitorear el proceso de fermentación y producción de la biomasa de interés de la presente investigación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, M. (2001). *determinación de oxígeno disuelto en aguas naturales, rsiduales y residuales tratadas*. Mexico D.F. Obtenido de <http://www.aniq.org.mx/Pqta/pdf/NMX-AA-quimicosgpo1.pdf>
2. Ariza, B. & Gonzalez, L. (1997). *Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato*. Bogotá.
3. Ariza, B. y Gonzalez, L. . (1997). *Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato*. Bogotá.
4. Carlile MJ. (2001). *The Fungi*. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, San Diego, p 70.
5. Carrillo, I. M., Aguilar, Z. M., Wong, P. J., & Muñiz, M. D. (2010). Biomass production of *Candida utilis* (Henneberg) Lodder y Kreger from molasses. . *U Tecnociencia*. 4, , Págs. 32-40.
6. Castellanos, C. (Noviembre – Diciembre de 1991). Estudio de levaduras de fermentación industrial . *Revista Alimentaria*, 7(33), pag. 18 - 25.
7. Chacón, V. A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (scp) en la agricultura y la industria. *Agronomía mesoamericana*. 15, Págs. 93-106.
8. Clarke, M. A., Roberts, E. J., & Godshall, M. A. (1986). Non-starch, soluble polysaccharides of sugar cane. Proc. South. Afr. Sug. Technol. Assoc. (SASTA) 60:58-61.
9. Clarke, M. A., Roberts, E. J., & y Godshall, M. A. (1986). Non-starch, soluble polysaccharides of sugar cane. Proc. South. Afr. Sug. Technol. Assoc. (SASTA) 60:58-61.
10. Conabio. (2009). *Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City*.
11. Conabio. (2009). *Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City*.
12. Cowan, C. P. (1983). *.Flora de Tabasco. Listados Floríst. México 1: 1–123*.

13. Darke, R. (1999). *Color Encycl. Ornam. Grasses 1–325*. Timber Press, Portland.
14. Haehn, H. (1991). *Bioquímica de las fermentaciones*. España: Editorial Aguilar.
15. Halasz, A. & Laszlity, R. (1991). *Use of Yeast biomass in food production*. Boston.
16. Halasz, A. y Laszlity, R. (1991). *Use of Yeast biomass in food production*. . Boston.
17. Hiriano S. & Upper C. (2000). *Bacterial in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae-a pathogen, ice nucleus, and epihyte*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vo 64 No. 3. 624-653.
18. Hiriano S. Upper C. (2000). *Bacterial in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae-a pathogen, ice nucleus, and epihyte*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vo 64 No. 3. 624-653.
19. Jorgensen, A. (1990). *Microbiología de las fermentaciones industriales* (Séptima Edición ed.). Zaragoza, España: Editorial Acribia.
20. Kendrick B. (2000). *The Fifth Kingdom*. 3<sup>o</sup> ed. Focus Publishing, Newburyport, p 112.
21. Laboratorio Nacional de Salubridad. (1978). *Determinación de pH en Alimentos*. Mexico D.F. Obtenido de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-317-S-1978.PDF>
22. Made, G. P., & Chen, J. (1977). Sugar cane handbook. *Willey-Interscience*, Pág. 947.
23. Malgoire JY, Bertout S, Renaud F, Bastide JM, Mallié M. (2005). *Typing of Saccharomyces cerevisiae clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism*». *J. Clin. Microbiol.* 43 (3): pp. 1133–7. doi:10.1128/JCM.43.3.1133-1137.2005. PMID 15750073.
24. Malgoire, J. Y; Bertout, S; Renaud, F; Bastide, J. M; Mallié, M. (2005). *Typing of Saccharomyces cerevisiae clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism*». *J. Clin. Microbiol.* 43 (3): pp. 1133–7. doi:10.1128/JCM.43.3.1133-1137.2005. PMID 15750073.

25. Malgoire, J. &. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* Clinical Strains by Using Microsatellite Sequence Polymorphism. *Journal Clin Microbiol*, Pág. 1.
26. Malgoire, J. Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J. M., & Mallié, M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* Clinical Strains by Using Microsatellite Sequence Polymorphism. *Journal Clin Microbiol*, Pág. 1.
27. McFarland L, & Bernasconi P. (1993). *Saccharomyces boulardii: a review of an innovative biotherapeutic agent*». *Microb Ecol Health Dis* 6: pp. 157–71.[doi:10.3109/08910609309141323](https://doi.org/10.3109/08910609309141323).
28. McFarland L, Bernasconi P. (1993). *Saccharomyces boulardii: a review of an innovative biotherapeutic agent*». *Microb Ecol Health Dis* 6: pp. 157–71.[doi:10.3109/08910609309141323](https://doi.org/10.3109/08910609309141323).
29. Meade, & Chen. (1977). *Cane Sugar Handbook*. (9. t. Edn., Ed.) Wiley.
30. Meade, G. P. y Chen, J. P. (1977). *Sugar cane handbook*. 10 ed. Willey-Interscience.
31. Miller, G. (1959). *Use of Dinitrosalisyc Acid Reagent for determination of reducing sugar*.
32. Naturland, A. (2000). *Agricultura Orgánica en el Tropicó y Subtropicó*.
33. Ospina, A. & Palacios, M. (1994). *Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A*. Cali.
34. Ospina, A. y Palacios, M. . (1994). *Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A*. Cali.
35. Owen, P. (1991). *Biotecnología de la Fermentación* . Zaragoza, España: Editorial Acribia.
36. Owen, P. (1991). Biotecnología de la fermentacion. *Editorial Acribia*, Págs. 27-36.
37. Pearson, D. (1993). *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.

38. Quintanilla, C. (2000). *Determinación de la Conductividad Electrolítica*. Mexico D.F.
39. Quintero, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica* (Primera ed.). México: Editorial Alambra.
40. Rodriguez, C. (2010). *Bases de la Producción Animal*. Sevilla, Universidad de Sevilla, España: Servicios de Publicaciones Universidad de Córdoba. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/43546362/Determinacion-de-Solidos-Totales#scribd>
41. Ruíz, F. S. (1995). *El cultivo de la caña de azúcar* (Vol. I). San Jose, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia San Jose.
42. Sarmiento A., Herrera J. . (2003). *Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. Trabajo de grado (Microbiología Industrial)*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. P 103.
43. Sarmiento, A; Herrera, J. (2003). *Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. Trabajo de grado (Microbiología Industrial)*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. P 103.
44. Serrano, D. Y. (2009). El proceso de fermentación. *Microbiología Industrial*. Obtenido de <http://facultad.bayamon.inter.edu/yserrano/microbiologia%20industrial/Proceso%20de%20fermentacion.pdf>
45. Skountzou, P. & Soupioni, M. & Bekatorou, A. & Kanellaki, M. & Koutinas, A. & Marchant, R. & Banat, I. (2003). *Lead(II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses* (Vol. 38).
46. Torata, G. A. (2011). *Ubicación Geográfica de Torata*. Obtenido de [http://www.gpatorata.gob.ec/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6&Itemid=41](http://www.gpatorata.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=6&Itemid=41)
47. Tuite, M. & Oliver, S. (1991). *Saccharomyces*. New York, Estados Unidos: Editorial Plenum Press.
48. Turégano, C. (2011). *Determinación de grados BRIX en jugos de especies vegetales productoras de azúcar y materiales azucarados*. Mexico D.F.

Obtenido de <http://www.cndsca.gob.mx/eficienciaproductiva/normas/2013/NMX-f-436-SCFI-2011.pdf>

49. Villa, J. (03 de 01 de 2014). *Salud y Buenos Alimentos*. Obtenido de Salud y Buenos Alimentos: <http://www.saludybuenosalimentos.es/alimentos/index.php?s1=Verduras%2FHortalizas&s2=Tallos&s3=Ca%F1a+de+Az%FAcar>
50. Villamil Y. & Zapata Y. (1999). *Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota.*
51. Villamil Y., Zapata Y. (1999). *Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota.*
52. Yopez, Y. (1995). *Selección de una cepa de Saccharomyces cerevisiae con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Bogotá.*
53. Zumbado, H. (2005). *Análisis químicos de los alimentos- métodos clásicos. Instituto de farmacias y alimentos. Universidad de la habana. , Págs. 434.*

## ANEXOS

### Anexo 1. Medición del jugo de caña para montaje de los bioreactores



### Anexo 2. Carga de los bioreactores



**Anexo 3.** Inoculación de la levadura en los bioreactores



**Anexo 4.** Adición de la levadura *Saccharomyces boulardii*



**Anexo 5. Colocación de las trampas de agua en los bioreactores**



**Anexo 6. Equipo Multiparametro utilizado para medir el pH, Oxígeno disuelto y la conductividad durante el proceso de fermentación**



### Anexo 7. Medición del pH en el jugo de caña de azúcar



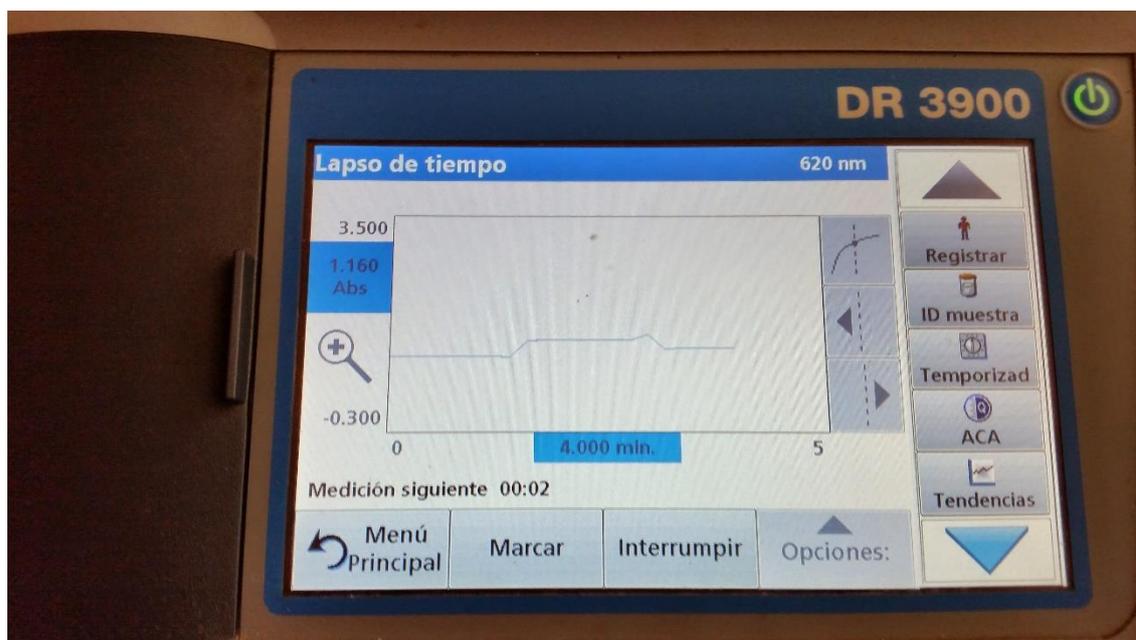
### Anexo 8. Calentamiento en baño María de las soluciones para la determinación de azúcares reductores



### Anexo 9. Cuantificación de azúcares reductores (glucosa)



### Anexo 10. Elaboración de la curva de calibración para la determinación de glucosa en el fermentado



## Anexo 11. Ficha técnica del microorganismo.

### FICHA TÉCNICA DEL MICROORGANISMO

Nombre del microorganismo: *Saccharomyces boulardii* L.

| CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO              | DESCRIPCIÓN (Y CLASIFICACIÓN CUANDO CORRESPONDA).   |
|---|---|
| <b>GENERALES</b>                                |   |
| Microscópicas                                   | Colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. |
| Tipo de cepa                                    | CMDM – PUJ 213  |
| Laboratorio                                     | MERCK   |
| <b>DE CRECIMIENTO</b>                           |   |
| Culturales                                      | Forman grandes colonias y son genéticamente resistentes a los antibióticos antimicrobianos  |
| Temperatura óptima                              | 37 °C   |
| pH óptimo                                       | 3 – 5   |
| Posee enzimas para realizar la fotoreactivación | No  |
| Compuestos químicos con efecto biostático       | No  |
| <b>NUTRICIÓN Y METABOLISMO</b>                  |   |
| Tipo de nutrición                               | Heterótrofo   |
| Fuentes de carbono que puede utilizar           | Carbohidratos hasta los aminoácidos.  |
| Fuentes de nitrógeno que puede utilizar         | amonio y aminoácidos  |