

**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A
BASE DE MELAZA DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA A PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae***

**MARÍA CAMILA CARDOZO GUZMÁN
JORGE HERNÁN MORENO CARDOZO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
JUNIO DE 2012**

**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO A
BASE DE MELAZA DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA A PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae***

**MARÍA CAMILA CARDOZO GUZMÁN
JORGE HERNÁN MORENO CARDOZO**

**Ingrid Schuler García
Bióloga PhD
Decana Académica**

**Janeth Arias Palacios
Bacterióloga M.Sc
Directora de Carrera**

**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO A
BASE DE MELAZA DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA A PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae***

**MARÍA CAMILA CARDOZO GUZMÁN
JORGE HERNÁN MORENO CARDOZO**

**Andrea Aguirre Rodríguez
Bacterióloga M.Sc
Directora**

**Ivonne Gutiérrez Rojas
Bacterióloga M.Sc
Codirectora**

JURADO

**Adriana Matiz Villamil
Bacterióloga M.Sc**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

1. RESUMEN

Objetivo: Diseñar y optimizar un medio a base de melaza de caña suplementado con macronutrientes y micronutrientes que favorezcan la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. **Metodología:** La cepa *Saccharomyces cerevisiae* INRA fue reconstituida en agar YPG y se conservó en glicerol 20% (v/v). Posteriormente se realizó una cinética preliminar en caldo YPG para conocer el comportamiento de la levadura y realizar una comparación con los resultados obtenidos en los medios a base de melaza de caña. Seguido a esto, se realizó un ensayo enzimático a diferentes concentraciones de invertasa y tiempos de acción para cuantificar los azúcares reductores presentes en la melaza. Luego se realizaron 3 cinéticas en solución de melaza al 10% (p/v), 20% (p/v) y 40% (p/v) para determinar la concentración a la cual se obtenía mayor producción de biomasa en melaza pura. A continuación se realizó el montaje del diseño Plackett Burman (screening primario) con 9 factores: extracto de levadura, sulfato de amonio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de zinc, tiamina y ácido pantoténico, para determinar la influencia que tiene cada uno de estos sobre la producción de biomasa. Finalmente se realizó un screening secundario comparando el mejor medio con una solución de melaza pura para determinar diferencias en cuanto a la producción de biomasa y demás parámetros medidos. **Resultados:** De acuerdo al análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$) realizado a los datos obtenidos en el Plackett no existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que algún componente nutricional está afectando directamente la producción de biomasa. Con respecto al screening secundario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de biomasa, sin embargo se observó una diferencia en el pH pero que no afectó la producción y viabilidad celular. **Conclusiones:** La melaza pura a una concentración de 20% (p/v) representa una buena fuente nutricional para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ya que cuenta con la mayoría de los macroelementos esenciales para el desarrollo de este microorganismo.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, uno de los principales objetivos de la biotecnología es mejorar los procesos de fermentación, disminuyendo los costos de producción y aumentando la productividad y rendimiento de estos. Por este motivo se han estudiado desechos orgánicos procedentes de la agro – industria, que no sólo resultan ser muy económicos, sino a su vez actúan como excelentes fuentes nutricionales (1).

Uno de los subproductos obtenidos es la melaza de caña, la cual se obtiene a partir del procesamiento de la caña de azúcar. Su alto porcentaje en carbono orgánico y presencia de algunos metales la convierten en una buena fuente nutricional para diversos grupos de microorganismos y que puede llegar potencializar la producción de biomasa.

Todo proceso biotecnológico debe pasar por una etapa de producción de biomasa, la cual al incrementarse puede verse reflejada en la producción y rendimiento de un metabolito de interés como bien puede ser el etanol o algunos ácidos entre otros. Sin embargo, la producción de biomasa puede verse afectada por condiciones ambientales (pH, temperatura, aireación, humedad) o también por factores metabólicos y fisiológicos propios de los microorganismos, cuando carecen de alguna fuente nutricional o por el contrario presentan exceso de alguna de estas.

Para evaluar este efecto, se emplean diferentes metodologías de respuesta, las cuales comprenden una serie de análisis matemáticos y estadísticos que permiten modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otra. Dentro de estas metodologías se encuentran los diseños factoriales simples, diseño Plackett Burman, diseño compuesto central, diseño equirradial y el diseño Box – Behnken.

Estos, pueden emplearse para optimizar los medios de cultivo para que se maximice la producción y rendimiento de biomasa, ya que pueden evaluarse diferentes concentraciones de nutrientes y determinar el efecto que cada una está generando sobre el producto de interés.

Estudios demuestran que la melaza a pesar de ser una buena fuente nutricional, no supe en su totalidad las concentraciones y nutrientes esenciales que requieren los microorganismos, luego es necesario suplementar la melaza de caña con diferentes nutrientes así como diseñar y optimizar un medio que mejore la producción de biomasa para posteriores procesos de producción. Insertar aca el N°del la ref del articulo

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue diseñar y optimizar un medio de cultivo empleando melaza de caña para la producción de biomasa a partir de *Saccharomyces cerevisiae* suplementado con diferentes nutrientes.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la creciente crisis energética, a nivel mundial se ha centrado la atención en las reservas limitadas naturales de combustibles fósil, lo que ha generado una creciente presión económica y comercial de aportes de energía más baratos y fiables. Por esta razón, se ha incrementado el interés en cuanto al desarrollo de energías renovables como lo es el bioetanol para ser empleado como biocombustible, por lo que es necesario utilizar fuentes más económicas que reduzcan los costos de producción y no compitan con los productos de alimentación. Al utilizar residuos o subproductos industriales no solo se están teniendo en cuenta otros sustratos potenciales, también se están solucionando problemas ambientales proporcionando una salida y aprovechamiento de los mismos, generando un impacto ambiental muy reducido, sin que la rentabilidad de la producción se vea afectada.

Sin embargo, para obtener este producto el primer paso debe ser la optimización y evaluación de los medios de cultivo, ya que es una parte importante en los procesos de producción de biomasa y fermentación teniendo en cuenta que las fuentes de carbono, macronutrientes, micronutrientes y vitaminas pueden influir en el desarrollo celular y en la acumulación de productos metabólicos en el interior de la célula y estos pueden actuar como inhibidores tanto del crecimiento y/o la obtención del producto de interés (2). Cuando se emplean sustratos complejos como la melaza de caña, la cual presenta en su composición un elevado contenido de carbono debido a su contenido de azúcares y ácidos orgánicos, nitrógeno, proteínas y otros compuestos inorgánicos son excelentes fuentes nutricionales para el crecimiento y metabolismos de diversos grupos de microorganismos, sin embargo, carece de algunos otros compuestos importantes que se encuentran en baja concentración. Para potencializar el uso y aprovechamiento de la melaza es necesario optimizar un medio de cultivo que supla los requerimientos nutricionales que la melaza no puede aportar (como lo son las vitaminas del complejo B) y algunos cofactores nutricionales que se encuentran en porcentajes muy bajos en la melaza con el fin de mejorar el rendimiento biomasa/sustrato y la productividad de los procesos biotecnológicos en los que se utilice este sustrato.

4. MARCO TEÓRICO

Saccharomyces cerevisiae es una levadura perteneciente al phylum *Ascomycota*, y se caracteriza por no presentar exigentes requerimientos nutricionales y condiciones ambientales para su desarrollo. Para su crecimiento requiere la presencia de macronutrientes, micronutrientes y algunos promotores de crecimiento como vitaminas. En la tabla No. 1 se resumen los principales elementos requeridos por *S. cerevisiae* para su crecimiento, la forma de adicionarle al medio de cultivo y la función que cumple a nivel celular.

Tabla 1. Requerimientos nutricionales de *S. cerevisiae*

Elemento	Forma de Adicionarlo en Medios de Cultivo	Función
Carbono	Compuestos Orgánicos <ul style="list-style-type: none"> - Ácidos Orgánicos - Carbohidratos: glucosa y sacarosa 	Principal fuente de carbono y energía. Bajo condiciones aerobias el 50% se incorpora a biomasa y el 50% restante se utiliza como fuente de energía bajo procesos de oxidación. Bajo condiciones anaerobias sólo el 30% es incorporado a biomasa.
Nitrógeno	Compuestos Inorgánicos <ul style="list-style-type: none"> - Sulfato de Amonio - Fosfato de Amonio - Compuestos Orgánicos <ul style="list-style-type: none"> - Peptona y Triptosa - Extracto de Levadura - Urea - Aminoácidos 	Constituye aproximadamente entre el 10 y el 14% en peso seco de la levadura. Se encuentra presente en proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y enzimas.
Fósforo	Compuestos Inorgánicos <ul style="list-style-type: none"> - Fosfato monobásico de potasio - Fosfato dibásico de potasio - Fosfato de sodio Compuestos Orgánicos <ul style="list-style-type: none"> - Extracto de levadura 	Constituye aproximadamente el 3% en peso seco de la levadura. Favorece la acumulación de energía, es constituyente de fosfolípidos, vitaminas, DNA y RNA y actúa en la transferencia de energía (ATP).
Potasio	Compuestos Inorgánicos <ul style="list-style-type: none"> - Fosfato monobásico de potasio 	Actúa en los procesos de transporte celular y

	<ul style="list-style-type: none"> - Fosfato dibásico de potasio - Fosfato de sodio <p>Compuestos Orgánicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Extracto de levadura 	regulador del potencial osmótico, a su vez, es cofactor enzimático y se requiere en el metabolismo de carbohidratos.
Azufre	<p>Compuestos Inorgánicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sulfato de amonio - Sulfato de magnesio <p>Compuestos Orgánicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aminoácidos azufrados 	Constituye aproximadamente el 1% en peso seco de la levadura. Es componente de la cisteína, cistina y metionina (aminoácidos), algunas vitaminas y es cofactor enzimático.
Magnesio	<p>Compuestos Inorgánicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cloruro de magnesio - Sulfato de magnesio 	Es cofactor enzimático de las enzimas que actúan en los procesos de glucólisis y ciclo de Krebs, es componente estructural de membranas y los ribosomas requieren iones magnesio.
Calcio	<p>Compuestos Inorgánicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cloruro de calcio 	Actúa como cofactor enzimático.

Fuente: (3-5)

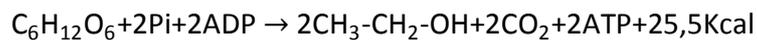
Hoy en día la producción de etanol ha tenido un gran auge, ya que es considerado como uno de los biocombustibles más prometedores procedentes de fuentes renovables y a su vez, es ampliamente utilizado para producción de medicamentos, cosméticos, materiales industriales, elaboración de bebidas alcohólicas, disolvente de nitrocelulosa, colorantes, resinas y aceites entre otros (6). En comparación con la producción química que genera altos costos industriales, la producción biológica mediada por microorganismos es una opción rentable ya que representa una forma de bioconversión de un subproducto o mal llamado “desecho” agro – industrial en un producto económicamente viable (7, 8). Es por esto motivo que se ha prestado interés en la producción de biomasa partir de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que la producción de etanol es proporcional a la concentración de biomasa presente.

La principal vía metabólica involucrada en la fermentación del etanol es la glucólisis (Embden – Meyerhof – Parnas o vía EMP), a través de la cual una molécula de glucosa se metaboliza y produce dos moléculas de piruvato en condiciones aerobias. Bajo condiciones anaerobias, el piruvato se reduce a etanol con la liberación de dióxido de carbono. En teoría el rendimiento producto/sustrato es de 0,511. Dos moléculas de ATP producidas en la glucólisis se utilizan para conducir la biosíntesis de las células levaduriformes, que involucra una variedad de reacciones dependientes de energía. Por otro lado, la producción de etanol está estrechamente ligada al crecimiento celular de la

levadura, lo que significa que la levadura es un co – producto a la hora de su obtención. Sin el consumo continuo del de ATP por el crecimiento celular, el metabolismo de la glucosa se interrumpiría inmediatamente debido a la acumulación intracelular de ATP que inhibe la fosfofructoquinasa, una de las enzimas reguladoras de la glicólisis (9).

El principal microorganismo productor de etanol es *Saccharomyces cerevisiae* y su potencial radica en la capacidad de tolerar rangos entre 14% y 17 % (v/v) de etanol, sin embargo durante el proceso de producción se puede ver afectado por factores como: altas concentraciones de azúcar (aproximadamente 40% (v/v)) que inhiben tanto la producción de biomasa como de etanol, temperaturas superiores a los 40°C minimizan la producción de etanol dejando rendimientos de hasta un 3% (v/v), por otro lado el etanol es inhibidor del crecimiento microbiano y afecta la viabilidad celular cuando se acumula tanto dentro como fuera de la célula (10).

En la ecuación a continuación se resume el proceso de fermentación para obtención de etanol:



El sustrato es el componente principal del coste para la producción de etanol a escala industrial y es esencial que la producción de etanol se lleve a cabo con sustratos fácilmente accesibles y baratos. Por lo tanto, los residuos orgánicos como el rastrojo de maíz, residuos del procesamiento de la caña (melaza), el trigo, silvicultura, desechos de las fábricas de papel, se pueden convertir en etanol.

Los procesos de fermentación a partir de cualquier material que contenga azúcar podrían derivar en etanol. Las diversas materias primas utilizadas en la producción de etanol a través de fermentación se clasifican en 3 grupos: azúcares, almidones y material lignino – celulósico. En los azúcares (a partir de remolacha, caña de azúcar, melaza y algunas frutas) se puede convertir directamente a etanol. Por el lado de los almidones (a partir del maíz, la yuca, la papa y tubérculos en general) deben sufrir en primera instancia un proceso de hidrolizado bien sea químico o enzimático. Finalmente los sustratos lignino – celulósicos (maderas, residuos agrícolas, linasa, residuos de pulpa y fábricas de papel) también deben sufrir procesos de hidrolizado para obtener azúcares de mas fácil asimilación (11).

El azúcar más ampliamente utilizado para la fermentación de etanol es la melaza, la cual es un jarabe oscuro, grueso, producido durante el refinamiento del azúcar que contiene aproximadamente un 50% en peso de azúcar y un 50% restante en compuestos orgánicos e inorgánicos inorgánicos a base de Fe, K, Ca, Na, Mg, Zn, As, Cd, Hg, Pb y Cl, NO₃ y SO₄ que tienen una influencia sobre el metabolismo de los microorganismos. Su potencial uso radica en que es una materia prima potencialmente barata y disponible. Esta se produce abundantemente en países como Colombia y Brasil y debido a su bajo costo es un factor

económico viable a la hora de emplearlo como sustrato nutricional en los procesos de fermentación. (12-14).

Para la optimización de los medios de cultivo, se emplea el diseño factorial, el cual se usa para encontrar como un objetivo en particular (producción de biomasa y etanol) se puede ver afectado por una serie de operaciones o variables sobre una región de interés, y también, los valores de las condiciones de operación que darán lugar a un máximo rendimiento resultado de la optimización. La principal ventaja de la aplicación de este diseño es en el número reducido de experimentos que se llevarán a cabo con la elección de los mejores puntos para obtener la máxima información (12).

También, dentro del estudio de la optimización de los medios, se emplea el método de respuesta en superficie, conocido como RSM por sus siglas en inglés (Response Surface Methodology), el cual define el efecto de las variables de proceso de forma independiente o en combinaciones, y genera un modelo matemático que describe todo el proceso. Además, en la RSM se resumen los métodos matemáticos y la inferencia estadística para una relación aproximada funcional entre una variable de respuesta y un conjunto de variables de diseño (10, 13). El diseño tipo RSM más empleado es el diseño compuesto central (Central Composite Design en inglés), que es una técnica eficaz y flexible que proporciona información suficiente sobre los efectos de las variables de proceso y el error experimental en general, con un número mínimo de experimentos (15).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Diseñar y optimizar un medio de cultivo empleando melaza de caña para la producción de biomasa a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2 Objetivos Específicos

- Establecer la concentración óptima de melaza que favorezca el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Evaluar la influencia de la fuente de nitrógeno y la adición de macro y Micronutrientes al medio melaza en la producción de biomasa utilizando un diseño Plakett-Burman

6. METODOLOGÍA

6.1 Microorganismo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* INRA utilizada en este estudio fue suministrada por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada. La cepa se encuentra conservada en glicerol al 30% (v/v) a -20°C .

6.2 Reactivación de la cepa

Se reactivó la cepa de *S. cerevisiae* INRA adicionando el contenido de cuatro viales de 1mL en cuatro tubos con 4mL de caldo YPG modificado (20g/L glucosa, 20g/L Triptosa, 10g/L Extracto de levadura). Por otro lado, se realizó una siembra masiva a partir de un vial en medio sólido YPG. Se incubaron durante 24 horas a 30°C . Para determinar la pureza se realizó coloración de Gram.

6.3 Realización del banco

A partir del crecimiento obtenido en el medio sólido, se preparó el inóculo realizando una suspensión directamente en 50mL de caldo YPG modificado en Erlenmeyer de 250mL, este se incubó durante 24 horas, a 33°C a 150rpm. Posteriormente se tomaron 25mL y se adicionaron en un Erlenmeyer de 250mL estéril. El agente empleado para la conservación fue Glicerina con un 90% (v/v) de pureza, de la cual se tomaron 25mL y se adicionaron en 50mL de caldo YPG estéril, se homogenizó la mezcla y se tomaron 25mL para luego adicionarlos al Erlenmeyer que ya contenía el inóculo. A partir de esta solución se prepararon 50 viales de 1mL cada uno con una concentración final de 25% (p/v) de glicerol (16).

6.4 Curva peso seco

Para la realización del inóculo se tomó un vial del banco y se reconstituyó en agar YPG modificado, este se dejó incubando durante 24 horas, a 30°C. Por otro lado se lavaron y esterilizaron 20 tubos falcon de 15mL y se dejaron secando en horno a 90°C durante 24 horas. Para la realización del inóculo se preparó una suspensión celular con una absorbancia superior a 0.90 y se inoculó directamente en 300mL de caldo YPG modificado, se mantuvieron las mismas condiciones de incubación, adicionalmente con una agitación de 150rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó el dato de absorbancia y se procedió a realizar los lavados con solución salina (0.85% p/v), se realizaron dos lavados completando a 50mL y se llevaron a centrifugar durante 20 minutos a 2250 g. Una vez obtenido el producto ya centrifugado se tomó nuevamente el valor de absorbancia y a partir de este se determinaron los valores para la preparación de las diluciones teniendo en cuenta que se encontraran en el rango de 0.1 a 1.0, ya obtenidos los valores de absorbancia se retiraron los tubos secos, se tomaron 10 tubos y se les adicionaron 10mL de la solución centrifugada, por otro lado, los 10 tubos restantes se les adicionaron 10mL de solución salina y todos fueron enviados a secado en horno a 90°C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de secado se determinó el promedio del peso de los 10 tubos que contienen las células y el de los 10 tubos que contienen la solución salina, para luego calcular la diferencia de peso entre el promedio de los tubos con células y los tubos con solución salina y así determinar las concentraciones de cada una de las diluciones y obtener la curva patrón de peso seco de *S. cerevisiae* que se trabajó durante todo el estudio (17)

6.5 Cinética Preliminar en Medio Comercial

Para la preparación del inóculo se reconstituyeron 3 viales en seis placas de agar YPG modificado, se incubaron durante 24 horas a 30°C, posteriormente se realizó una suspensión celular en 100 mL de caldo YPG modificado estéril hasta obtener una absorbancia cercana a 1.0 y un recuento en cámara de Neubauer de 10^8 células/ml. A continuación se inocularon 30 mL en cada una de los erlenmeyers con 270 ml de medio YPG modificado estéril, llevándolas a un volumen final de 300 ml, las cuales fueron incubadas a 33°C durante 12 horas a 150 rpm. Se realizaron 8 muestreos respectivamente (horas 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12), para la determinación del recuento en cámara, se tomaron 0,5mL de cada erlenmyer y se adicionaron 3 gotas de azul de metileno para determinar la viabilidad. Para la determinación de la biomasa, se tomaron 10mL en tubos Falcon y se llevaron a centrifugar durante 20 minutos a 2250 g. siguiente a este paso se resuspendió en solución salina y se realizaron dos lavados más, finalmente se tomó lectura de absorbancia a 620 nm en cada uno de los tiempos muestreo.

6.6 Determinación de Azúcares Reductores y Azúcares totales en la melaza

Se preparó una solución de melaza al 10% (p/v) y se estandarizó el pH a 4,5 empleando HCl 1N. A esta solución se le realizó la técnica del ácido 3,5 Dinitro Salicílico (DNS) (18) sin realizar ningún tratamiento enzimático para obtener el dato de los azúcares reductores presentes en la solución de melaza. Para la determinación de los azúcares reductores totales, se realizaron 6 ensayos por triplicado en tubos que contenían 4mL de esta solución y diferentes concentraciones de enzima invertasa (Bio-Cat, Inc.) evaluadas a diferentes tiempos según reportes bibliográficos (19, 20). En la tabla No. 2 se presenta el diseño de los experimentos. Posteriormente a cada uno de ellos se le realizó la técnica de DNS. Luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multivariado para determinar la influencia que presentaba tanto el tiempo de acción como la concentración de enzima para así determinar cual tratamiento arrojaba el mayor dato de azúcares reductores totales.

Tabla 2. Ensayo enzimático con diferentes concentraciones de invertasa para la determinación azúcares reductores totales

Tubo	Ensayo	Concentración de enzima (μL)	Tiempo de Evaluación (Min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
1	1	25	5	60
2			10	
3			15	
4	2	50	5	
5			10	
6			15	
7	3	100	5	
8			10	
9			15	
10	4	150	5	
11			10	
12			15	
13	5	200	5	
14			10	
15			15	
16	6	500	5	
17			10	
18			15	

Fuente: Autores

6.7 Estandarización de la Melaza

Se prepararon 500mL de una solución al 40% (p/v) de melaza de caña, a esta solución se le realizaron 4 ciclos de centrifugación a 4000 rpm y entre cada uno de los ciclos se realizó una medición de absorbancia para evaluar la remoción de sólidos en suspensión presentes en la melaza hasta obtener valores de absorbancia cercanas 0.0. Una vez terminados los ciclos de centrifugación se realizó una coloración de Gram para evaluar la presencia de contaminantes presentes en la melaza y finalmente se sometió a 3 ciclos de esterilización. A partir de la solución ya tratada, se prepararon 3 erlenmeyers con una concentración al 10% (p/v), 3 erlenmeyers con una concentración al 20% (p/v), y 4 erlenmeyers con la concentración de la misma (40% p/v) todos con un volumen final de 130mL, a cada uno de estos se les adicionaron 10g/L de extracto de levadura y 100mg/L de cloranfenicol. Se determinó el pH inicial, y se realizó la técnica de DNS y ensayo con invertasa para determinar los azúcares reductores presentes.

6.8 Determinación de Concentración Inicial de Melaza (Fuente de Carbono)

Para la realización del inóculo se reconstituyeron 2 viales en agar YPG y se dejaron incubando durante 24 h a 30°C, posterior al tiempo de incubación se realizó una suspensión celular en 200mL de caldo YPG hasta obtener una absorbancia entre cercana a 1.0 y se inocularon 20mL de esta suspensión en cada uno de los erlenmeyers para obtener un volumen final de 150mL. Luego se llevaron a incubar durante 12hrs a 33°C y 150 rpm. Se realizaron 8 muestreos respectivamente (horas 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12), en cada hora de muestreo se tomaron 5,5mL y se centrifugaron a 2220g por 20 minutos, los extractos obtenidos fueron congelados y los pellets fueron lavados con solución salina, este procedimiento se realizó 3 veces. Una vez terminados los lavados, se realizó la lectura espectrofotométrica a 620nm; posteriormente se transformó a la concentración de biomasa (g/L) con la ecuación de peso seco obtenida. Adicionalmente se realizó el recuento de viabilidad en cámara de Newbauer. Con los extractos obtenidos, se determinó el pH, se realizó la técnica de DNS para determinar azúcares reductores y el tratamiento con invertasa según el numeral 6.5 para determinar los azúcares reductores totales.

6.9 Screening Primario

Se aplicó un diseño Plackett Burkman (21) con 9 factores: extracto de levadura, sulfato de amonio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de zinc, tiamina y ácido pantoténico, para determinar la influencia que tiene cada uno de estos sobre la producción de biomasa, estas fuentes y concentraciones fueron seleccionadas a partir de una revisión bibliográfica que se presenta en la tabla No. 3. Cada variable fue evaluada a dos niveles: bajo y alto, denominados (-1) y (+1) respectivamente en 12 experimentos por triplicado, los cuales se presentan en la tabla No. 4. Como fuente de carbono se empleó la concentración de melaza óptima obtenida en el numeral 6.8. Los erlenmeyers se llevaron a incubación a

30°C, 150rpm durante 12 horas, de acuerdo a lo establecido con la cinética preliminar de crecimiento en el medio YPG. Se tomaron muestreos en las horas 8 y 10 para la cuantificación de biomasa, para ello, se tomaron 10mL en cada tiempo de muestreo y se centrifugaron a 2250rpm, se realizaron dos lavados con solución salina y finalmente se realizó una lectura espectrofotométrica a 620nm.

Tabla 3. Selección de Fuentes Nutricionales

Elemento	Fuente	Concentración (g/L)	Referencia
Nitrógeno	Extracto de Levadura	1	(22) (1) (14) (15)
		3	(23) (24)
		6	(7)
		Sulfato de Amonio (NH₄)₂SO₄	2
	9		(12)
	4		(6)
	1		(21)
	1,5		(25) (20)
	0,2		(26)
	Fósforo y Potasio	Fostato monobásico de potasio KH₂PO₄	1,5
10			(12)
0,7			(23)
0,1			(14) (20)
Fosfato dibásico de potasio K₂HPO₄		5	(12)
Azufre	Sulfato de Magnesio MgSO₄	1	(6)
		2,5	(12)
		0,1	(20)
		0,5	(13)
Magnesio	Sulfato de Magnesio MgSO₄	1	(6)
		2,5	(14)
		0,1	(22)
		0,5	(13)
	Cloruro de Magnesio	0,07	(15)
Calcio	Cloruro de calcio CaCl₂	0.3	(7)
		0.01	(14)

Zinc	Cloruro de zinc ZnCl₂	0.4	(27)
------	--	-----	------

Fuente: Autores

Tabla 4. Screening Primario- Valores en g/L

Exp	Extracto de levadura	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	ZnCl ₂	Tiamina	Ácido pantoténico
1	3	1	1	5	3	0,3	0,2	0,03	0,3
2	3	9	5	1	3	0,1	0,2	0,01	0,3
3	6	9	1	5	3	0,1	0,6	0,01	0,2
4	6	9	1	5	1	0,1	0,2	0,03	0,3
5	6	9	5	1	3	0,3	0,2	0,03	0,2
6	6	1	5	1	1	0,1	0,6	0,03	0,3
7	3	9	5	5	1	0,3	0,6	0,01	0,3
8	3	1	5	5	3	0,1	0,6	0,03	0,2
9	6	1	1	1	3	0,3	0,6	0,01	0,3
10	3	1	1	1	1	0,1	0,2	0,01	0,2
11	3	9	1	1	1	0,3	0,6	0,03	0,2
12	6	1	5	5	1	0,3	0,2	0,01	0,2

Fuente: Autores

6.10 Screening Secundario

Se realizó una cinética al medio que presentó mayor producción de biomasa y a un medio con solución de melaza al 20% (p/v). Para la realización del inóculo se reconstituyeron 2 viales en agar YPG y se dejaron incubando durante 24h a 33°C, posterior al tiempo de incubación se realizó una suspensión celular en 200mL de caldo YPG hasta obtener una absorbancia de 0.935 y se inocularon 15mL de esta suspensión en cada uno de los erlenmeyers para obtener un volumen final de 150mL. Luego se llevaron a incubar durante 10hrs a 33°C y 150 rpm. Se realizaron 6 muestreos respectivamente (horas 0, 2, 4, 6, 8 y 10), en cada hora de muestreo se tomaron 5 mL y se centrifugaron a 2220g por 20 minutos, los extractos obtenidos fueron congelados y los pellets fueron lavados con solución salina, este procedimiento se realizó 3 veces. Una vez terminados los lavados, se realizó la lectura espectrofotométrica a 620nm para obtener la concentración de biomasa (g/L), adicionalmente se realizó el recuento de viabilidad en cámara de Newbauer y se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando azul de metileno. Con los extractos obtenidos, se determinó el pH, se realizó la técnica de DNS para determinar azúcares

reductores y el tratamiento con invertasa según el numeral 6.5 para determinar los azúcares reductores totales.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Curva de Peso Seco

Mediante la técnica de peso seco se determinó que la concentración inicial del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* fue 0,924g/L y a partir de esta se obtuvo la curva patrón donde se evaluó la absorbancia vs la concentración celular. Se realizó una regresión lineal, donde el coeficiente de correlación es igual a 0,993 lo que demuestra que existe una relación lineal entre las variables lo que confirma el cumplimiento de la ley de Beer – Lambert que establece que la absorbancia es directamente proporcional al producto entre la absorbancia de la muestra y su concentración.

La ecuación de peso seco obtenida fue:

$$y = 1,651X + 0,044 \quad R^2 = 0,993 \quad (2)$$

Para los experimentos posteriores, los valores de absorbancia fueron reemplazados en esta ecuación.

7.2 Curva Control

En la tabla No. 5 (Véase anexo 2) se presentan los resultados obtenidos con respecto al comportamiento de la levadura en medio comercial YPG, el inóculo tenía una absorbancia inicial de 0,935 (0,539g/L) y un recuento en cámara de $2,90 \times 10^6$ cél/mL (Log = 6,462). En la figura 1 se observa la fase de adaptación durante las primeras 2 horas, posteriormente entre las horas 2 a 8 se presentó la fase exponencial, cuyo punto máximo se logra hacia la hora 8 en donde el valor de biomasa es de 1,861g/L, finalmente la fase estacionaria se alcanza en la hora 8 y se prolongó hacia la hora 12. Por otro lado, en la tabla No. 6 (Véase anexo 3) se presentan los resultados de cumplimiento a cinética de orden 1.

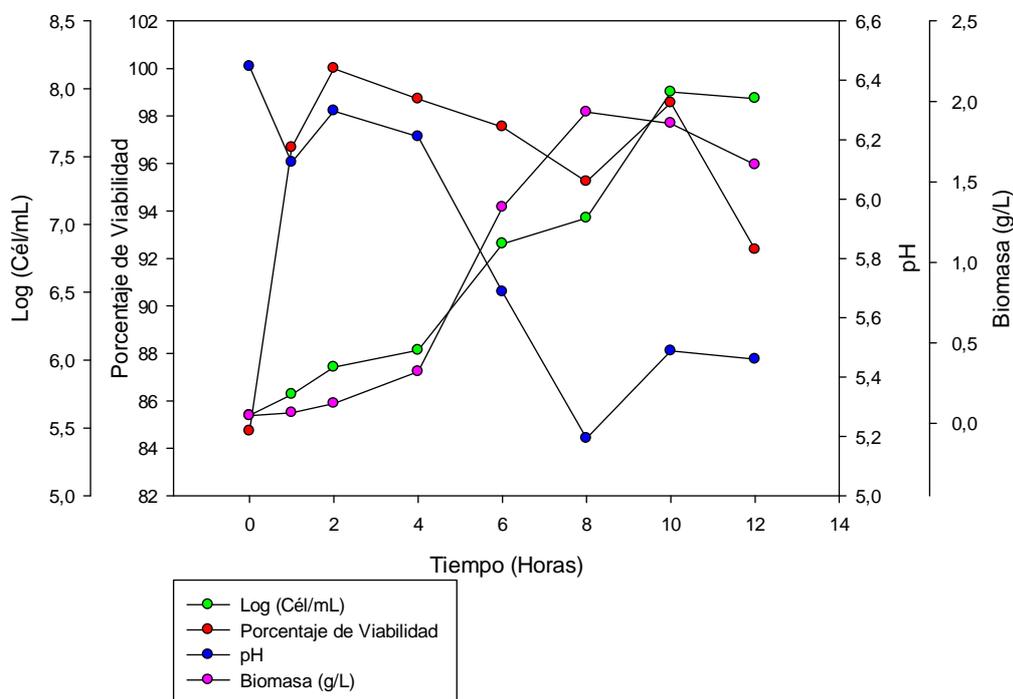


Figura 1. Comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG.

Este comportamiento era el esperado en caldo YPG y las fases de crecimiento coinciden con lo reportado por Rubio *et al.*, 2008. Por otro lado, comparando los datos de cinética con los obtenidos en este estudio, los valores de biomasa son diferentes (1,933 g/L y 3 g/L) probablemente debido a la concentración inicial del inóculo empleado, los valores de μ_x ($0,5896 \text{ h}^{-1}$ y $0,318 \text{ h}^{-1}$) también difieren, sin embargo, los valores de tiempo de duplicación también difieren pero son menores en este estudio (1,18 h y 1,28 h). Estos datos indican que a pesar de que la cepas presentan una diferente velocidad de crecimiento, el tiempo de duplicación es mucho más corto

En cuanto al pH este se mantiene en un rango entre 5.0 y 6.0, el cual es el óptimo para el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* tal y como lo demuestra Rubio *et al.*, 2008 en su estudio. Es por esto que los rangos de porcentaje de viabilidad se mantienen constantes a lo largo del estudio, lo que demuestra que ya que no se ve afectada la polaridad de la membrana.

Finalmente, los valores de biomasa cuantificados por dos métodos distintos muestran una tendencia similar, sin embargo los valores medidos por recuento en cámara presentan una fase exponencial más prolongada en comparación con el método por espectrofotometría, sin embargo estos valores no son comparables estadísticamente debido a las unidades de medida.

7.3 Determinación de azúcares reductores y azúcares reductores totales en la melaza

En la tabla No. 7 (Véase anexo 4) se presentan los resultados de los azúcares reductores presentes en la solución de melaza y los azúcares reductores totales que se obtuvieron posteriores al hidrolizado enzimático con la enzima invertasa. Mediante un análisis ANOVA ($P < 0,05$) (Véase anexo 5) el mejor ensayo fue el 3 (concentración de enzima de 100 μL y 15 minutos de reacción) donde se logró cuantificar la mayor concentración de azúcares reductores totales.

La enzima invertasa ($\beta - D -$ fructofuronidasa EC 3.2.1.26) cataliza la hidrólisis de la sacarosa, llevando a cabo un desdoblamiento del extremo no reductor $\beta - D -$ fructofurosido, en una mezcla equimolar de glucosa y fructosa conocido como azúcar invertido. Para que se de la hidrólisis, se requieren las condiciones de acidez, ya que los iones H^+ actúan como catalizadores de la reacción. En comparación con la hidrólisis química con HCl o H_2SO_4 se obtiene un mayor rendimiento de conversión del producto (19, 28).

7.4 Determinación de Concentración Inicial de Melaza (Fuente de Carbono)

En las figuras 2 a 4 se presentan las cinéticas en las diferentes soluciones de melaza. Se observa que la fase de adaptación va desde las horas 0 a la hora 2, la fase exponencial se extiende hasta la hora 8 en la solución al 10% (p/v), hora 10 en la solución al 20% (p/v) y hora 12 en la solución al 40% (p/v). En cuanto a la fase estacionaria, para la solución al 10% (p/v) se prolonga desde la hora 8 a 12, en la solución al 20% (p/v) se prolonga hasta la hora 12 y en la solución al 40% (p/v) no se observa una fase estacionaria. En las tablas de la 8 a la 13 (véase anexos 6 al 11) se encuentran los resultados de cada una de las cinéticas y los datos correspondientes a las cinéticas de orden 1.

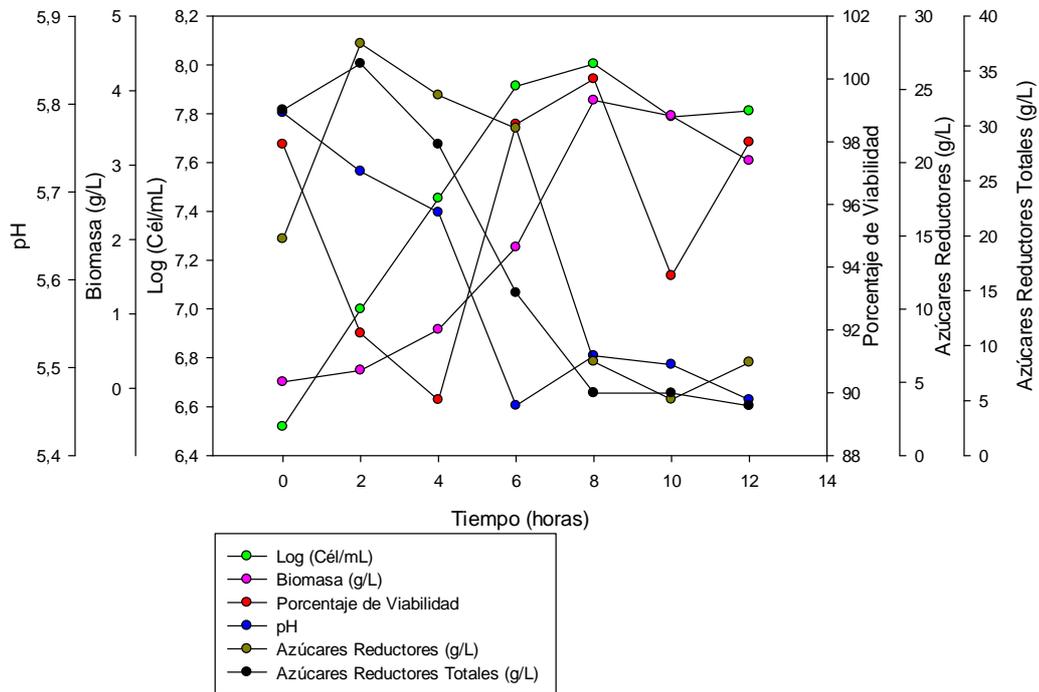


Figura 2. Comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en la solución de melaza al 10% (p/v) suplementada con 10g/L de extracto de levadura.

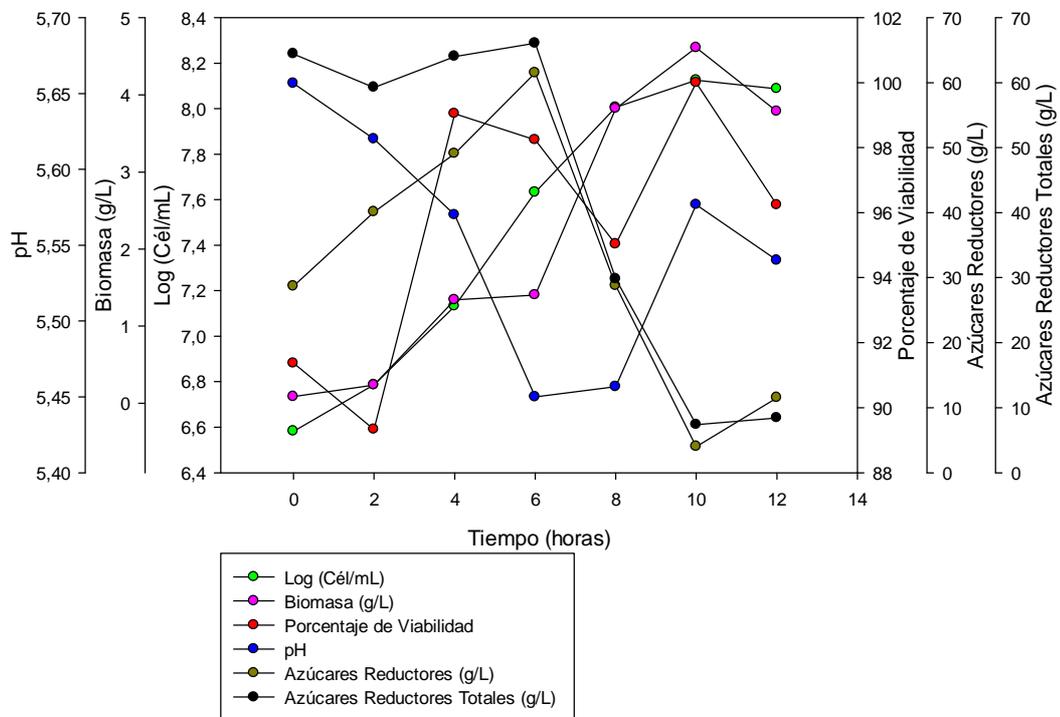


Figura 3. Comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en la solución de melaza al 20% (p/v) suplementada con 10g/L de extracto de levadura.

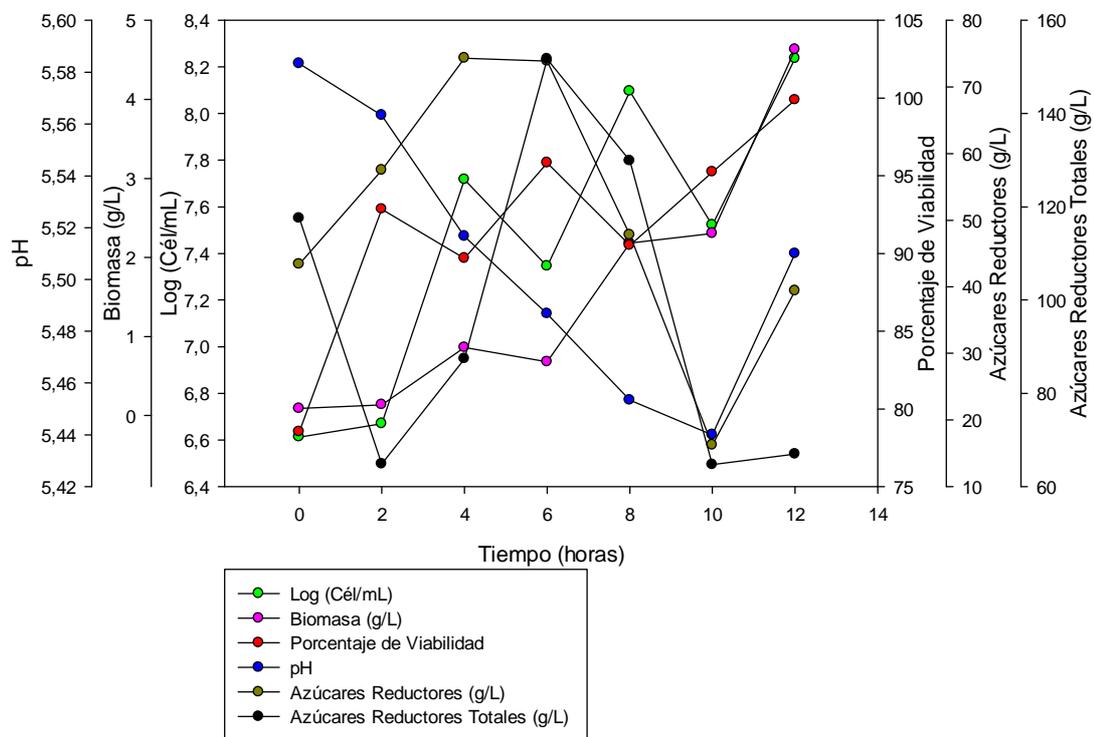


Figura 4. Comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en la solución de melaza al 40% (p/v) suplementada con 10g/L de extracto de levadura.

Como se observa en los resultados obtenidos, el orden de los medios en los que se obtiene una mayor producción de biomasa y recuento es en la solución al 20% (p/v) > 40% (p/v) > 10% (p/v). De acuerdo con Laluece *et al.*, 2009 concentraciones >40% pueden generar inhibición por sustrato, esto se evidencia en la biomasa en la solución al 40% en donde la levadura entra en fase exponencial hacia la hora 6 y así mismo no se observa un comportamiento claro en las fases de crecimiento. En cuanto a las concentraciones del 10% y 20% se observa un comportamiento similar, con la diferencia en que se obtiene una mayor producción de biomasa en la solución al 20% (p/v) producto de una mayor disponibilidad de azúcares.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los porcentajes de viabilidad se encuentran entre un rango del 90% al 100% en las diferentes soluciones. Para la determinación de las células muertas, se empleó el colorante azul de metileno, aunque también es común utilizar el azul de tripan, los cuales penetran la membrana celular de las levaduras y la colorean de azul, debido a que se ha perdido la permeabilidad de las mismas.

La pérdida de permeabilidad en la membrana puede darse por estrés oxidativo, acumulación de sustrato y la producción de etanol, sin embargo este no es el caso, ya que

los porcentajes son superiores al 90%, esto se debe a que la gran mayoría de células no ha perdido la permeabilidad de la membrana, producto de la presencia de ácidos grasos insaturados como los ácidos palmitoleico (C 16:1) y oleico (C 18:1) al incrementar la fluidez de la membrana celular (9, 29) , por otro lado el ergosterol actúa confiriendo rigidez a la membrana (30), así mismo, la presencia de aminoácidos como la prolina que mejora la estabilidad de las proteínas y membrana e inhibe la agregación de proteínas durante el plegamiento proteico (29).

Como se observa en los resultados, el pH de las diferentes soluciones se mantuvo ligeramente ácido entre un rango de 5.0 a 6.0, que no varía mucho y el cual favorece la producción de biomasa y el hidrolizado enzimático para la cuantificación de los azúcares reductores totales.

Esta estabilidad se debe por un lado al pH propio de la melaza que se encuentra también bajo estos mismos rangos y también debido a la capacidad buffer que presenta la melaza, es por esto que mantener la estabilidad en el pH es importante, ya que cuando varían las concentraciones de H⁺ en la solución, se pueden cambiar las cantidades de carga de la membrana citoplasmática de la levadura, y como resultado alterar la permeabilidad de la membrana y afectar la asimilación de las fuentes de carbono, nitrógeno y demás sales inorgánicas presentes en el medio (13, 31)

Como se observa en las figuras 2 – 4, a pesar de que el comportamiento de los azúcares reductores y azúcares reductores totales es muy similar, en algunas horas de cultivo se presentan incrementos de la concentración de azúcares, esto se debe a la acción de la enzima sacarasa o invertasa producida por *S. cerevisiae* a lo largo del cultivo, esta enzima hace que se consuma el sustrato presente (sacarosa) produciendo glucosa y fructosa que son de fácil asimilación (32), este proceso recibe el nombre de inversión de la sacarosa, y es dependiente de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo, ya que esta es un inhibidor de la biosíntesis de la enzima, por otro lado esta enzima se puede ver afectada por condiciones de pH y también por la temperatura, ya que a temperaturas poco óptimas para el desarrollo de *S. cerevisiae* se ve afectada la producción de la invertasa debido a que esta enzima está situada en la superficie de la célula (33), sin embargo la levadura posee una serie de mecanismos de tolerancia bajo condiciones adversas, en el caso de la temperatura, se promueve la producción de proteínas de choque térmico que aseguran el plegamiento o replegamiento de proteínas o enzimas que se han visto afectadas (29).

7.5 Screening primario

En las tablas No. 14 y 15 (Véase anexos 12 y 13), se presentan los resultados obtenidos en el diseño Plackett – Burman. Como se puede observar fue necesario realizar dos montajes, ya que inicialmente en el primer montaje (tabla 14), al realizar el análisis estadístico no se obtuvo ninguna diferencia sobre la variable de respuesta – biomasa g/L– en cada uno de los experimentos realizados ($P < 0,05$), así mismo, los valores del porcentaje de coeficiente de variación se encontraban muy por encima de los rangos ($>20\%$). Luego, para observar alguna diferencia sobre la producción de biomasa se optó por realizar una modificación en las concentraciones del plackett de la siguiente manera: las concentraciones más altas serían los valores (+1) y las más bajas los valores (0), evaluando ahora bajo el esquema ausencia – presencia, y se corrió el diseño nuevamente bajo las condiciones ya establecidas en el anterior montaje, con la única diferencia que se muestrearon únicamente las horas 10 y 12.

Una vez realizado el segundo montaje, mediante un análisis ANOVA ($P < 0,05$) (Véase anexo 14), se demostró que ninguna variable está influyendo directamente sobre la producción de biomasa, por tal motivo no se pudo llevar a cabo la optimización de las concentraciones de las variables evaluadas. Sin embargo se corrió nuevamente un ANOVA ($P < 0,05$) para determinar si existía evidencia estadísticamente significativa de los experimentos sobre la variable de respuesta productividad. A partir de estos resultados, el medio que presentó influencia estadísticamente significativa sobre la producción de biomasa fue el medio del experimento N°5 con un valor de 7,340g/L y así mismo arrojó el mejor valor de productividad 0,734g/L/h. De acuerdo al diseño planteado estos resultados se correlacionan con las concentraciones establecidas ya que estos medios contenían en su mayoría el valor +1 (presencia) de los nutrientes adicionados.

En las figuras 5 y 6 se presenta la influencia que presentaba cada uno de los experimentos sobre la biomasa. Adicionalmente en la tabla No. 16 se observan los resultados obtenidos para biomasa y productividad del segundo montaje teniendo en cuenta que con base a estos se realizó el screening secundario.

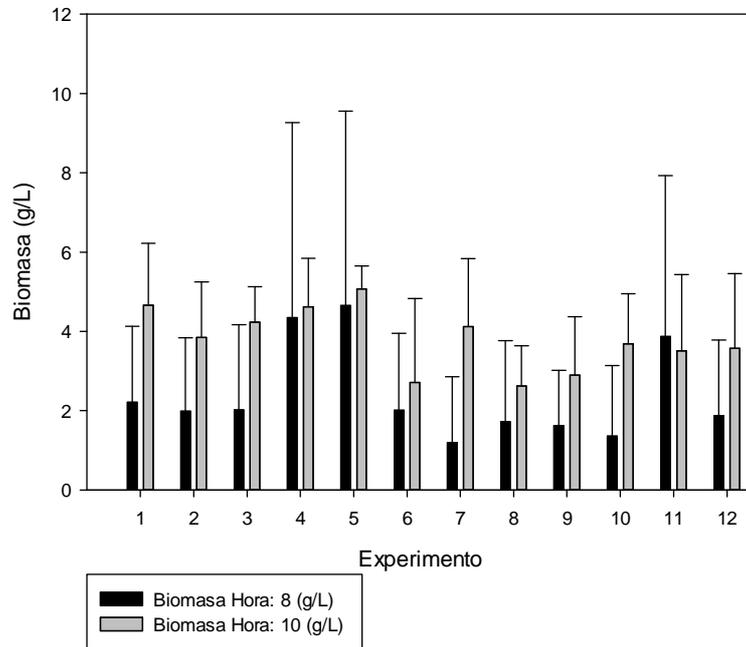


Figura 5. Perfil de la concentración de biomasa (g/L) para cada uno de los experimentos realizados en el primer montaje del Plackett.

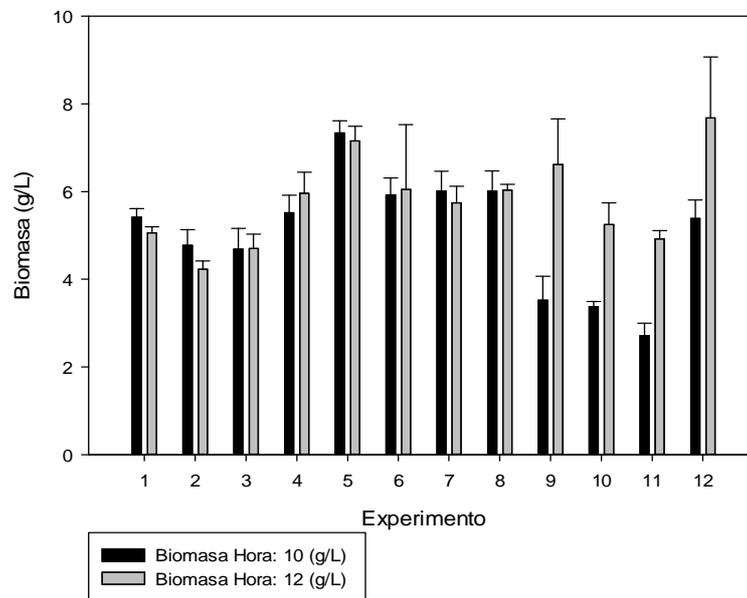


Figura 6. Perfil de la concentración de biomasa (g/L) para cada uno de los experimentos realizados en el segundo montaje del Plackett.

Tabla 16. Comparación de los valores de productividad y biomasa para las horas del segundo montaje.

Exp	X g/L (H: 10)	P g/L/h (H: 10)	X g/L (H: 12)	P g/L/h (H: 12)
1	5,414	0,541	5,060	0,422
2	4,777	0,478	4,226	0,352
3	4,692	0,469	4,704	0,392
4	5,523	0,552	5,966	0,497
5	7,340	0,734	7,160	0,597
6	5,925	0,593	6,050	0,504
7	6,013	0,601	5,742	0,478
8	6,017	0,602	6,035	0,503
9	3,520	0,352	6,619	0,552
10	3,380	0,338	5,247	0,437
11	2,710	0,271	4,922	0,410
12	3,871	0,387	7,678	0,640

Como se observa en las anteriores figuras, en el primer montaje realizado los valores de biomasa no superaron los 5g/L en comparación en el segundo montaje donde los valores de biomasa estuvieron por encima de los 5g/L y muy cercanos a los 8g/L. Sin embargo en el estudio realizado por Ortiz *et al*,2007, obtuvieron valores de biomasa superiores a 20g/L, empleando un medio a base de solo melaza de caña y un tiempo de fermentación de 20 horas (34).

La diferencia en la producción de biomasa entre los dos, radica en la ausencia o presencia de los macro y micronutrientes que requiere *S. cerevisiae* para llevar a cabo su metabolismo. Aunque no fue posible llevar a cabo la optimización del medio debido a que ninguna variable afecta la producción, pero en conjunto sí se genera alguna influencia positiva sobre la biomasa.

Esto se debe a la acción que generan principalmente los macroelementos como el nitrógeno adicionado en forma de extracto de levadura y sulfato de amonio que favorece la viabilidad celular como y maximiza el rendimiento tanto de la producción de biomasa como etanol, sin embargo, cuando la fuente de carbono se encuentra en concentraciones muy elevadas (> 40%) se disminuye la asimilación del nitrógeno y se generan subproductos que pueden resultar nocivos para las células (23). Por otro lado, la adición de fuentes de fosfato como el fosfato monobásico de potasio y fosfato dibásico de potasio, e incluso en combinación con el nitrógeno como el fosfato de amonio también influyen en el crecimiento de *S. cerevisiae* ya que suplementan la deficiencia que muchas veces presentan las melazas en fosforo y nitrógeno (12). Así mismo, las fuentes de magnesio y zinc adicionadas influyen en el mecanismo enzimático de la vía glucolítica que

favorece tanto la asimilación de los compuestos carbonados como la producción de energía en forma de ATP (27).

Finalmente la tiamina y el ácido pantoteico actúan como cofactores de crecimiento, ya que *S. cerevisiae* carece de la producción de estas vitaminas, sin embargo la adición de estas incrementan notablemente los costos de producción y según los resultados obtenidos en este estudio no mejoran la producción de biomasa.

Sin embargo, actualmente en el mercado se comercializan suplementos nutricionales y vitamínicos destinados a la producción de biomasa, basándose en la producción de energía celular, como es el caso del NUTRIPLEX, que en su composición se encuentra producto de hojas de alfalfa, algas, hígado bovino, raíz de Ginseng, semillas de quinoa, semillas de girasol, hoja de Ginko, harina de almendra, nuez de cola, caña de azúcar, vitaminas B, C, E, ácido fólico, bioflavonoides, antioxidantes, carotenoides, ácidos grasos esenciales, selenio, zinc, magnesio, calcio, manganeso, fosforo, potasio, minerales y enzimas entre otros.

7.6 Screening Secundario

En las figuras 7 y 8 se presentan las cinéticas en medio melaza 20% (p/v) y el experimento No. 5.

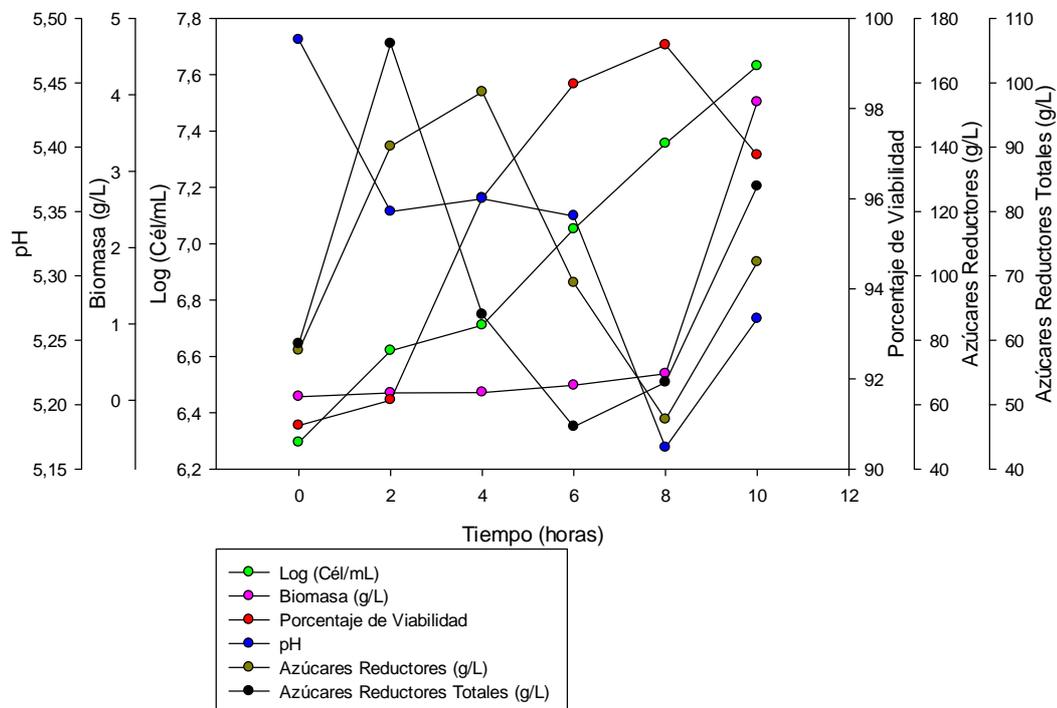


Figura 7. Comportamiento de *S. cerevisiae* en solución de melaza al 20% sin ningún suplemento nutricional.

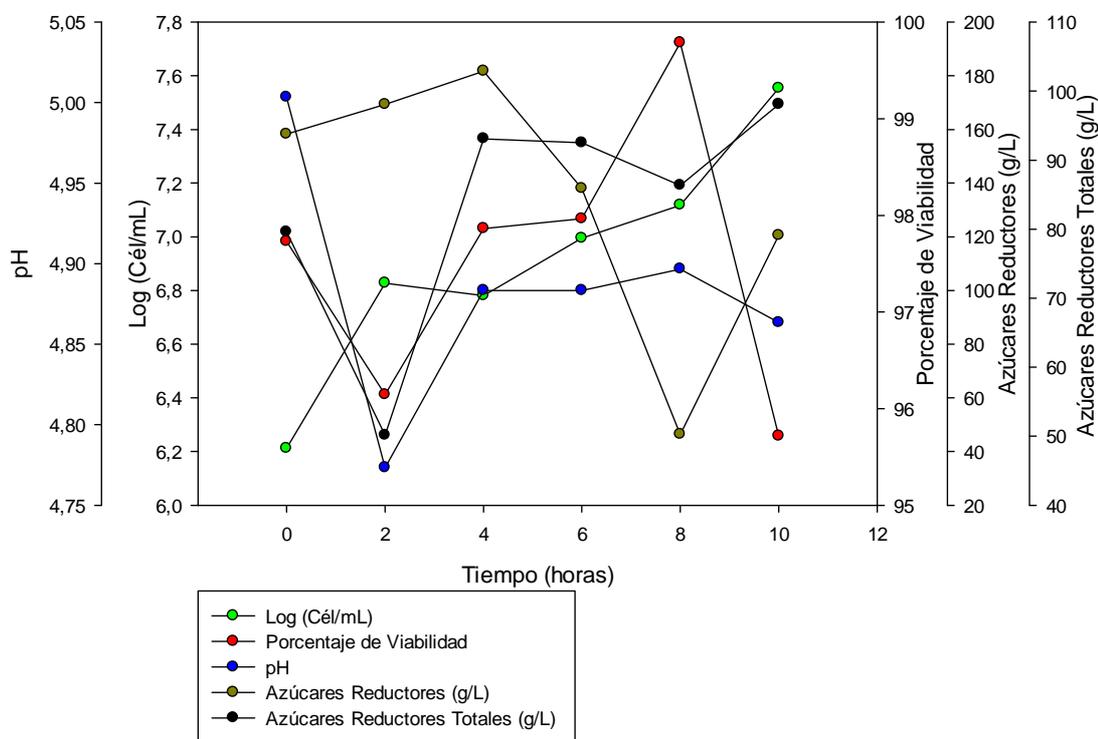


Figura 8. Comportamiento de *S. cerevisiae* en el medio con mejor respuesta a la producción de biomasa después del Plackett.

Como se observa no se logró cuantificar biomasa por el método de espectrofotometría en el experimento 5 ya que se generó una precipitación que interfirió en la lectura espectrofotométrica, esto se puede asociar a que a concentraciones muy elevadas de sales inorgánicas se genera una reacción con la melaza que produce la precipitación, así mismo, como se observa en el análisis físico – químico de la melaza (anexo 1) el nitrógeno y el potasio se encuentran en elevadas concentraciones, luego al adicionar más de estas fuentes generan un exceso de acumulación .

En el medio melaza al 20% (p/v) se observa una fase estacionaria que se prolonga desde las horas 0 a 8 y un punto de la fase exponencial en la hora 10 que arroja un valor de biomasa de aproximadamente 4 g/L.

En cuanto al Log de los recuentos, porcentajes de viabilidad, productividad, y pH se observa un comportamiento muy similar con las cinéticas del numeral 7.2. Adicionalmente se realizó un análisis t – student para el medio melaza 20% (p/v) y el experimento 5 (Véase anexos 15 al 17), con el que se demostró que no hay evidencia estadísticamente significativa para el Log de los recuentos, los porcentajes de viabilidad y la productividad, lo que demuestra que la melaza sola es suficiente para la producción de biomasa y no es necesario adicionar más nutrientes a esta.

Sin embargo, estos valores comparados con los de la cinética preliminar en caldo YPG (numeral 7.2) demuestran que la producción de biomasa y porcentajes de viabilidad mejoran en los medios a base de melaza de caña, lo que demuestra que emplear estos sustratos en la industria disminuyen los costos de producción y mejoran la producción de biomasa, ya que actualmente en el mercado 2kilos de melaza cuestan \$5.000, mientras que 1kilo de caldo YPG cuesta alrededor de \$100.00.

8. CONCLUSIONES

- No se observan diferencias significativas al suplementar el medio de cultivo a base de melaza de caña con macronutrientes y micronutrientes evaluados, donde se evidencie influencia sobre la producción de biomasa (g/L).
- La melaza pura a una concentración de 20% (p/v) representa una buena fuente nutricional para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ya que cuenta con la mayoría de los macroelementos esenciales para este microorganismos.
- Concentraciones muy elevadas de las sales inorgánicas puede llevar a que se de algún tipo de reacción con la melaza y generar un precipitado que interfiere con las lecturas en espectrofotometría y arrojan falsos positivos en los datos de biomasa.
- La biotina y el ácido pantoténico en este estudio no fueron influyentes, por tal razón se puede prescindir de estas vitaminas disminuyendo los costos de producción

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar cada uno de los componentes empleados por separado y determinar bajo que concentraciones se comienza a generar precipitación.
- Evaluar un suplemento de melaza con diferentes fuentes de nitrógeno y fósforo tanto orgánico como inorgánico.
- Evaluar el suplemento de la melaza con productos ofrecidos en el mercado, que favorecen la producción de biomasa maximizando la obtención de energía.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy*. 2010;**87**(1):96-100.
2. Zhang T, Wen S, Tan T. Optimization of the medium for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 2007;**42**(3):454-8.
3. Madigan Michael, Martinko J, Dunlap P, D C. Brock *Biología de los Microorganismos*. 12 ed. Madrid, España. 2009. 1259 p.
4. Moore E. *Fundamentals of the fungi*. Fourth edition ed. Upper Saddle River, New Jersey. 1996. 574 p.
5. Michael Shuler, Kargi F. *Bioprocess engineering basic concepts*. Second Edition ed. Upper Saddle River, New Jersey. 2002. 553 p.
6. Moon S-K, Kim SW, Choi G-W. Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321. *Journal of Biotechnology*. 2012;**157**(4):584-9.
7. Turhan I, Bialka KL, Demirci A, Karhan M. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2010;**101**(14):5290-6.
8. Yu J, Xu Z, Tan T. Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Processing Technology*. 2008;**89**(11):1056-9.
9. Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 2008;**26**(1):89-105.
10. Laluce C, Tognolli JO, De Oliveira KF, Souza CS, Morais MR. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2009;**83**(4):627-37.
11. Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;**69**:627-42.
12. Ergun M, Ferda Mutlu S. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2000;**73**(3):251-5.
13. Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*. 2007;**98**(15):2824-8.
14. Ghorbani F, Younesi H, Esmaeili Sari A, Najafpour G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*. 2011;**36**(2):503-9.
15. Shafaghat H, Najafpour GD, Rezaei PS, Sharifzadeh M. Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for the ethanol production: the application of the response surface methodology. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*. 2010;**16**(2):199-206.
16. Pedroza A, Matiz A, Quevedo B, Aguirre A. *Manual de Introducción a la Biotecnología*. 1 ed. Bogotá, Colombia. 2007.

17. Rubio A, Hernández M, Aguirre A, Poutou R. Identificación preliminar *in vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *RevMVZ Córdoba*. 2008;**13**(1):1157-69.
18. Miller G. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;**31**(3):426-8.
19. Andjelkovic' U, Picuric' S, Vujcic' Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*. 2010;**120**:799-804.
20. Amaya-Delgado L, Hidalgo - Lara M.E, Montes - Horcasitas M.C. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*. 2006;**99**:299-304.
21. Plackett, R. & Burman, J. The Design of Optimun Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 1946;**33**(4):305-25.
22. Ogbonna J, Mashima H, Tanaka H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*. 2001;**76**:1-8.
23. Laopaiboon L, Nuanpeng S, Srinophakun P, Klanrit P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology*. 2009;**100**(18):4176-82.
24. Yu J, Zhang X, Tan T. Optimization of media conditions for the production of ethanol from sweet sorghum juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 2009;**33**(3):521-6.
25. Cáceres-Farfán M, Lappe P, Larqué-Saavedra A, Magdub-Méndez A, Barahona-Pérez L. Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technology*. 2008;**99**(18):9036-9.
26. Siqueira PF, Karp SG, Carvalho JC, Sturm W, Rodríguez-León JA, Tholozan J-L. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*. 2008;**99**(17):8156-63.
27. Hashem M, Darwish SMI. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 2010;**34**(7):953-9.
28. Shaheen I, Bhatti HN, Ashraf T. Production, purification and thermal characterisation of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*. 2008;**43**:1152-8.
29. Ma M, Liu L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;**87**:829-45.
30. Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;**85**:253-63.
31. Liu R, Shen F. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*. 2008;**99**(4):847-54.
32. Takeshige K, Ouchi K. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995;**79**(5):449-52.

33. Zech M, Görisch H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: Reversible inactivation by components of industrial molasses media. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995;**17**(1):41-6.
34. Ortiz Á, Reuto J, Fajardo E, Sarmiento S, Aguirre A, Arbeláez G, et al. Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum*. 2008;**13**(2):138-48.

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización físico – química de la melaza.



Calle 79 B No. 70 - 16 Bogotá, D. C.
PBX: 223 1999
Fax: 223 4087
e-mail: agrilab@etb.net.co

Página 1 de 1

**Laboratorio de Análisis Químicos
Insumos Agrícolas**

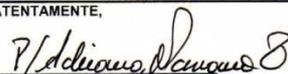
Registrado ante el ICA según Resolución 000584

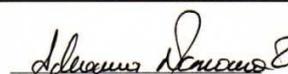
Remitente	Sr. JORGE HERNÁN MORENO CARDOZO		
Identificación suministrada	NINGUNA		
Descripción	Líquido Café	No. Laboratorio	MO 13137
Fecha de Ingreso	02-Dic-11	Fecha de Entrega	13-Dic-11
CARACTERIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DE MATERIAL ORGÁNICO LÍQUIDO			
PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDADES	MÉTODO ANALÍTICO
Carbono Orgánico Oxidable Total	452	g/L	WALKLEY-BLACK(NTC 5167)
pH	5,46		POTENCIOMÉTRICO
Densidad (20°C)	1,29	g/c.c.	GRAVIMÉTRICO (NTC 5167)
Conductividad Eléctrica (1:200)	0,53	dS/m	CONDUCTÍMETRO
Sólidos Insolubles	26,6	g/L	GRAVIMÉTRICO (NTC 5167)
Nitrógeno (Norg+NNH4+NNH2)	7,39	g/L	SUMATORIA
Fósforo Soluble (P2O5)	0,21	g/L	COLORIMÉTRICO (NTC 5167)
Potasio Soluble (K2O)	54,4	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Calcio Soluble (CaO)	1,95	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Magnesio Soluble (MgO)	0,78	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Azufre Soluble	1,29	g/L	TURBIDIMÉTRICO (NTC 5167)
Hierro Soluble	0,02	g/L	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Manganeso Soluble	3,5	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Cobre Soluble	2,3	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Zinc Soluble	2,6	p.p.m	ABS. ATÓMICA (NTC 5167)
Boro Soluble	1,7	p.p.m	COLORIMÉTRICO (NTC 5167)
Sodio Soluble	0,08	g/L	EMISIÓN DE LLAMA (NTC 5167)

OBSERVACIONES:

1. Si usted tiene alguna inquietud, queja o reclamo sobre sus resultados, por favor comuníquese con el Director técnico o con el Coordinador de área.
2. El alcance de la responsabilidad de AGRILAB en el presente informe, se limita a la realización de los análisis de laboratorio relacionados y descritos anteriormente, más NO A GARANTIZAR los productos en su concepción, diseño, calidad y eficiencia.
3. Los resultados analíticos consignados en el presente informe corresponden exclusivamente a la muestra enviada por el cliente y no a otro(s) materiales de la misma procedencia.
4. La contramuestra de la muestra analizada se almacenará por un periodo de tiempo de 6 meses, luego será desechada.

ATENTAMENTE,


MYRIAM BENDECK LUGO
Química Director Técnico PQ-1168


ADRIANA NAVARRO URDANETA
Lic. Química Coordinadora de Área

Anexo 2. Tabla 5. Curva de Caracterización en caldo YPG

Tiempo	Recuento en Cámara			Porcentaje de Viabilidad			pH			Biomasa (g/L)		
	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V.	PROM	DESV. EST	% C.V
0	5,593	0,111	1,989	84,722	16,839	19,876	6,447	0,035	0,537	0,048	0,006	12,778
1	5,748	0,084	1,468	96,667	5,774	5,973	6,123	0,287	4,680	0,066	0,018	27,692
2	5,948	0,092	1,542	100,000	0,000	0,000	6,297	0,119	1,894	0,124	0,024	19,544
4	6,072	0,038	0,619	98,718	2,221	2,249	6,210	0,291	4,682	0,321	0,044	13,842
6	6,858	0,060	0,872	97,537	0,812	0,832	5,687	0,143	2,519	1,343	0,181	13,488
8	7,049	0,084	1,197	95,238	8,248	8,660	5,193	0,430	8,277	1,933	0,143	7,388
10	7,976	0,115	1,439	98,551	2,510	2,547	5,488	0,069	1,252	1,863	0,086	4,611
12	7,929	0,026	0,323	92,375	6,612	7,158	5,460	0,058	1,064	1,607	0,191	11,895

Anexo 3. Tabla 6. Datos Cinética Orden 1 en caldo YPG

Tiempo	X/Xo	Ln (X/Xo)
0	1	0
1	1,354	0,303
2	2,563	0,941
4	6,635	1,892
6	27,717	3,322
8	39,900	3,686
10	38,456	3,650
12	33,161	3,501

$$\text{Ecuación: } y = 0,5896 - 0,3015 R^2 = 0,9925 \quad (3)$$

$$\mu_X = 0,5896$$

$$T_d = 1,18 h^{-1}$$

Anexo 4. Tabla 7. Determinación de azúcares reductores totales posterior al tratamiento enzimático.

Ensayo	Azúcares Reductores (g/L)			Promedio	DV	%CV
Concentración: 25UI						
5 Min	9,084	10,147	9,421	9,550	0,543	5,690
10 Min	9,119	9,403	9,314	9,279	0,145	1,563
15 Min	6,461	6,372	6,426	6,420	0,045	0,695
Concentración: 50uL						
5 Min	9,846	8,960	9,296	9,367	0,447	4,775
10 Min	10,307	10,253	10,183	10,248	0,062	0,607
15 Min	9,314	9,580	9,332	9,409	0,149	1,580
Concentración: 100uL						
5 Min	11,405	11,494	11,937	11,612	0,285	2,453
10 Min	11,015	10,909	10,820	10,915	0,098	0,894
15 Min	12,008	11,866	11,884	11,919	0,077	0,648
Concentración: 150uL						
5 Min	8,038	7,117	6,798	7,318	0,644	8,803
10 Min	9,066	9,314	9,332	9,237	0,149	1,609
15 Min	7,365	7,507	7,489	7,453	0,077	1,036
Concentración: 200uL						
5 Min	11,299	11,565	11,334	11,399	0,144	1,266
10 Min	10,271	9,952	10,218	10,147	0,171	1,684
15 Min	10,218	10,519	10,023	10,253	0,250	2,438
Concentración: 500uL						
5 Min	10,767	11,104	10,803	10,891	0,185	1,699
10 Min	10,041	9,403	9,793	9,745	0,322	3,300
15 Min	10,218	10,023	10,005	10,082	0,118	1,170
Slón. Melaza 10%	7,879	7,950	7,684	7,837	0,008	3,015

ANEXO 5: Análisis para la Determinación de azúcares reductores

Response: AR

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	112.16	17	6.60	6.366E+007	< 0.0001	significant
A	79.18	5	15.84	6.366E+007	< 0.0001	
B	6.30	2	3.15	6.366E+007	< 0.0001	
AB	26.68	10	2.67	6.366E+007	< 0.0001	
Pure Error	0.000	36	0.000			
Cor Total	112.16	53				

The Model F-value of 63660000.00 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, AB are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Std. Dev.	0.000	R-Squared	1.0000
Mean	9.74	Adj R-Squared	1.0000
C.V.	0.000	Pred R-Square	1.0000
PRESS	0.000	Adeq Preciso	

The "Pred R-Squared" of 1.0000 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 1.0000.

Term	Coefficient		Standard Error	95% CI	
	Estimate	DF		Low	High
Intercept	9.74	1	0.000	9.74	9.74
A[1]	-1.32	1	0.000	-1.32	-1.32
A[2]	-0.061	1	0.000	-0.061	-0.061
A[3]	1.75	1	0.000	1.75	1.75
A[4]	-1.73	1	0.000	-1.73	-1.73
A[5]	0.86	1	0.000	0.86	0.86
B[1]	0.29	1	0.000	0.29	0.29
B[2]	0.19	1	0.000	0.19	0.19
A[1]B[1]	0.85	1	0.000	0.85	0.85
A[2]B[1]	-0.59	1	0.000	-0.59	-0.59
A[3]B[1]	-0.16	1	0.000	-0.16	-0.16
A[4]B[1]	-0.97	1	0.000	-0.97	-0.97
A[5]B[1]	0.51	1	0.000	0.51	0.51
A[1]B[2]	0.67	1	0.000	0.67	0.67
A[2]B[2]	0.38	1	0.000	0.38	0.38
A[3]B[2]	-0.76	1	0.000	-0.76	-0.76
A[4]B[2]	1.04	1	0.000	1.04	1.04
A[5]B[2]	-0.65	1	0.000	-0.65	-0.65

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{AR} = & \\
 & +9.74 \\
 & -1.32 * \text{A}[1] \\
 & -0.061 * \text{A}[2] \\
 & +1.75 * \text{A}[3] \\
 & -1.73 * \text{A}[4] \\
 & +0.86 * \text{A}[5] \\
 & +0.29 * \text{B}[1] \\
 & +0.19 * \text{B}[2] \\
 & +0.85 * \text{A}[1]\text{B}[1] \\
 & -0.59 * \text{A}[2]\text{B}[1] \\
 & -0.16 * \text{A}[3]\text{B}[1] \\
 & -0.97 * \text{A}[4]\text{B}[1] \\
 & +0.51 * \text{A}[5]\text{B}[1]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&+0.67 * A[1]B[2] \\
&+0.38 * A[2]B[2] \\
&-0.76 * A[3]B[2] \\
&+1.04 * A[4]B[2] \\
&-0.65 * A[5]B[2]
\end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage	Student Residual	Cook's Distance	Outlier t
1	9.55	9.55	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
2	9.55	9.55	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
3	9.55	9.55	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
4	9.37	9.37	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
5	9.37	9.37	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
6	9.37	9.37	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
7	11.61	11.61	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
8	11.61	11.61	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
9	11.61	11.61	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
10	7.32	7.32	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
11	7.32	7.32	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
12	7.32	7.32	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
13	11.40	11.40	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
14	11.40	11.40	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
15	11.40	11.40	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
16	10.89	10.89	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
17	10.89	10.89	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
18	10.89	10.89	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
19	9.28	9.28	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
20	9.28	9.28	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
21	9.28	9.28	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
22	10.25	10.25	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
23	10.25	10.25	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
24	10.25	10.25	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
25	10.91	10.91	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
26	10.91	10.91	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
27	10.91	10.91	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000

28	9.24	9.24	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
29	9.24	9.24	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
30	9.24	9.24	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
31	10.15	10.15	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
32	10.15	10.15	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
33	10.15	10.15	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
34	9.75	9.75	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
35	9.75	9.75	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
36	9.75	9.75	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
37	6.42	6.42	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
38	6.42	6.42	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
39	6.42	6.42	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
40	9.41	9.41	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
41	9.41	9.41	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
42	9.41	9.41	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
43	11.92	11.92	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
44	11.92	11.92	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
45	11.92	11.92	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
46	7.45	7.45	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
47	7.45	7.45	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
48	7.45	7.45	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
49	10.25	10.25	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
50	10.25	10.25	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
51	10.25	10.25	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
52	10.08	10.08	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
53	10.08	10.08	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000
54	10.08	10.08	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Outlier t versus run order to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

Anexo 6. Tabla 8. Comportamiento en solución de melaza al 10% (p/v)

Tiempo	Células/mL			Porcentaje de Viabilidad			pH			Biomasa (g/L)			DNS - 1			DNS - 2		
	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V.	Prom. X	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V
0	6,52	0,02	0,26	97,92	3,61	3,69	5,79	0,00	0,00	0,09	0,01	9,47	14,79	0,40	2,73	31,46	5,39	17,13
2	7,00	0,07	0,93	91,89	2,73	2,97	5,72	0,01	0,10	0,24	0,01	5,07	28,12	9,81	34,87	35,67	4,43	12,41
4	7,45	0,09	1,19	89,77	11,94	13,30	5,68	0,01	0,10	0,79	0,03	3,92	24,60	1,26	5,11	28,33	9,30	32,81
6	7,91	0,03	0,39	98,55	2,51	2,55	5,46	0,02	0,28	1,90	0,05	2,45	22,34	19,39	86,80	14,79	0,53	3,59
8	8,00	0,06	0,81	100,00	0,00	0,00	5,51	0,01	0,21	3,87	0,05	1,16	6,41	1,35	21,05	5,68	1,47	25,95
10	7,79	0,25	3,19	93,72	7,30	7,79	5,50	0,01	0,21	3,66	0,36	9,71	3,83	0,48	12,52	5,67	1,03	18,23
12	7,81	0,18	2,29	97,99	0,74	0,76	5,46	0,01	0,11	3,06	0,31	10,03	6,36	0,44	6,99	4,52	0,63	13,99

Anexo 7. Tabla 9. Datos Cinética Orden 1 en solución de melaza al 10%

X/Xo	Ln (X/Xo)
1,000	0,000
2,739	1,008
8,959	2,193
21,492	3,068
43,844	3,781
41,501	3,726
34,654	3,545

Ecuación: $y = 0,4597 - 0,7058 R^2 = 0,9867$ (4)

$\mu_X = 0,4597$

$T_d = 1,18 h^{-1}$

Anexo 8. Tabla 10. Comportamiento en solución de melaza al 20% (p/v)

Tiempo	Células/mL			Porcentaje de Viabilidad			pH			Biomasa (g/L)			DNS - 1			DNS - 2		
	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V.	Prom. X	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V
0	6,58	0,08	1,27	91,37	2,99	3,27	5,66	0,01	0,20	0,09	0,01	16,30	1,00	0,00	28,70	0,43	1,49	64,42
2	6,79	0,29	4,22	89,33	5,88	6,58	5,62	0,02	0,36	0,24	0,02	6,66	2,76	1,02	40,12	5,94	14,82	59,27
4	7,13	0,11	1,56	99,05	1,65	1,67	5,57	0,01	0,18	1,34	0,14	10,19	15,60	2,75	49,10	2,43	4,95	64,02
6	7,63	0,22	2,82	98,25	3,04	3,09	5,45	0,00	0,00	1,40	0,15	10,96	16,37	2,80	61,51	6,88	11,19	66,05
8	8,00	0,05	0,67	95,03	0,60	0,64	5,46	0,04	0,64	3,82	0,39	10,27	44,54	3,80	28,78	8,22	28,55	29,80
10	8,13	0,14	1,78	100,00	0,00	0,00	5,58	0,01	0,10	4,61	0,01	0,32	53,72	3,98	4,03	0,27	6,65	7,38
12	8,09	0,13	1,63	96,24	1,92	2,00	5,54	0,01	0,18	3,78	0,96	25,34	44,10	3,79	11,52	1,17	10,16	8,43

Anexo 9. Tabla 11. Datos Cinética Orden 1 en solución de melaza al 20%

X/Xo	Ln (X/Xo)
1,000	0,000
2,760	1,015
15,600	2,747
16,367	2,795
44,536	3,796
53,722	3,984
44,104	3,787

Ecuación: $y = 0,3493x + 1,4703$ $R^2 = 0,8779$ (5)

$\mu_X =$ NO APLICA

$T_d =$ NO APLICA

Anexo 10. Tabla 12. Comportamiento en solución de melaza al 40% (p/v)

Tiempo	Células/mL			Porcentaje de Viabilidad			pH			Biomasa (g/L)			DNS - 1			DNS - 2		
	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V.	Prom. X	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V	PROM	DESV. EST	% C.V
0	6,61	0,07	1,08	78,52	5,60	7,13	5,58	0,01	0,21	0,09	0,02	19,18	1,00	0,00	43,39	3,77	8,69	117,57
2	6,67	0,23	3,52	92,85	4,91	5,29	5,56	0,02	0,27	0,14	0,04	33,04	1,53	0,43	57,48	4,67	8,12	64,86
4	7,72	0,55	7,10	89,70	4,18	4,66	5,52	0,02	0,28	0,86	0,08	9,76	9,73	2,27	74,30	2,99	4,03	87,40
6	7,35	0,07	0,92	95,83	7,22	7,53	5,49	0,03	0,46	0,68	0,06	9,30	7,69	2,04	73,86	5,78	7,83	151,65
8	8,10	0,56	6,94	90,53	9,13	10,09	5,45	0,01	0,21	2,18	0,22	10,20	24,69	3,21	47,77	11,17	23,39	129,87
10	7,52	0,04	0,51	95,24	8,25	8,66	5,44	0,03	0,55	2,30	0,10	4,46	26,06	3,26	16,23	3,15	19,39	64,71
12	8,24	0,13	1,53	99,88	0,21	0,21	5,51	0,03	0,48	4,63	0,85	18,32	52,35	3,96	39,37	11,78	29,91	67,00

Anexo 11. Tabla 13. Datos Cinética Orden 1 en solución de melaza al 40%

X/Xo	Ln (X/Xo)
1,000	0,000
2,760	1,015
15,600	2,747
16,367	2,795
44,536	3,796
53,722	3,984
44,104	3,787

Ecuación: $y = 0,0507x + 2,0533 \quad R^2 = 0,562 \quad (6)$

$\mu_X =$ NO APLICA

$T_d =$ NO APLICA

Anexo 12. Tabla 14. Diseño Plackett – Burman, influencia sobre la biomasa (Primer Montaje)

Hora: 8

Exp	Biomasa (g/L)									Prom	Desv. Est	% C.V
	R1			R2			R3					
1	2,229	1,938	2,223	3,919	4,676	4,670	3,271	3,301	3,313	3,282	1,019	31,057
2	2,005	1,866	1,569	3,374	4,500	4,591	3,386	3,459	3,471	3,135	1,099	35,053
3	2,035	2,168	1,896	4,833	5,051	5,021	2,592	2,665	2,695	3,218	1,344	41,758
4	4,361	4,942	4,482	4,337	4,658	4,591	3,089	3,271	3,277	4,112	0,700	17,020
5	4,670	4,918	4,973	4,016	4,270	4,343	0,830	0,824	0,842	3,298	1,875	56,832
6	2,029	1,962	2,017	2,980	4,191	4,361	1,593	1,611	1,605	2,483	1,102	44,363
7	1,211	1,678	1,514	3,761	4,337	4,373	1,884	1,950	1,950	2,518	1,263	50,168
8	1,738	2,065	1,950	3,598	4,627	4,779	0,478	0,909	0,951	2,344	1,612	68,783
9	1,641	1,411	1,508	2,180	2,514	2,514	1,211	2,102	2,150	1,915	0,483	25,228
10	1,375	1,799	1,775	3,719	3,973	4,137	2,453	2,483	2,489	2,689	1,019	37,875
11	3,889	4,076	3,870	2,520	3,095	3,101	2,241	2,344	2,326	3,051	0,741	24,284
12	1,890	1,926	1,732	2,199	4,331	4,422	2,647	2,701	2,689	2,726	1,004	36,824

HORA: 10

1	6,176	6,090	5,890	4,571	5,197	5,184	2,585	3,118	3,225	4,671	1,377	29,481
2	2,219	2,425	2,379	4,690	5,350	5,390	4,224	3,891	4,144	3,857	1,246	32,296
3	ND	ND	ND	4,264	5,150	5,243	3,171	3,831	3,878	4,256	0,809	19,014
4	5,477	5,710	5,417	4,551	5,303	5,483	2,685	3,505	3,538	4,630	1,114	24,067
5	5,383	5,697	5,943	3,824	4,850	4,884	5,077	4,970	5,097	5,081	0,602	11,845
6	2,758	2,905	2,832	4,151	5,084	5,117	0,480	0,606	0,620	2,728	1,848	67,747
7	5,823	5,876	5,763	3,751	4,344	4,424	2,352	2,392	2,439	4,129	1,496	36,228
8	2,165	2,505	2,392	3,505	3,884	3,904	1,086	2,099	2,145	2,632	0,945	35,925
9	4,264	4,684	4,497	1,339	1,692	1,726	2,372	3,698	1,899	2,908	1,359	46,751
10	2,439	2,365	2,225	4,557	5,010	5,024	3,924	3,858	3,898	3,700	1,110	30,013
11	5,343	5,363	5,297	1,366	1,606	1,532	3,778	3,618	3,751	3,517	1,668	47,433
12	4,677	5,537	5,856	1,499	1,586	1,806	3,804	3,744	3,798	3,590	1,651	45,980

Anexo 13. Tabla 15. Diseño Plackett – Burman, influencia sobre la biomasa (Segundo Montaje)

Hora: 10

Exp	Biomasa (g/L)									Prom	Desv. Est	% C.V
	R1			R2			R3					
1	5,360	5,312	5,312	5,209	5,257	5,276	5,784	5,621	5,597	5,414	0,201	3,710
2	4,549	4,585	4,658	5,251	5,209	5,276	4,416	4,537	4,512	4,777	0,357	7,482
3	4,343	4,409	4,373	4,379	4,379	4,397	5,270	5,294	5,385	4,692	0,469	10,000
4	5,990	6,110	6,030	5,177	5,197	5,217	5,337	5,303	5,343	5,523	0,396	7,168
5	7,326	7,377	7,640	7,530	7,640	7,564	6,970	7,030	6,979	7,340	0,281	3,828
6	6,083	6,136	6,190	6,203	6,236	6,243	5,370	5,490	5,377	5,925	0,389	6,570
7	5,417	5,497	5,950	5,776	5,963	5,823	6,578	6,571	6,541	6,013	0,451	7,507
8	5,657	5,856	5,856	5,617	5,710	5,643	6,839	6,476	6,498	6,017	0,460	7,648
9	3,943	4,113	4,028	2,835	2,804	2,810	3,652	3,767	3,725	3,520	0,547	15,543
10	3,271	3,295	3,234	3,531	3,495	3,489	3,283	3,398	3,422	3,380	0,112	3,304
11	2,962	3,028	2,962	2,271	2,380	2,386	2,756	2,810	2,835	2,710	0,288	10,612
12	5,577	5,770	5,790	4,684	5,250	5,283	ND	ND	ND	5,392	0,417	7,729

Hora: 12

1	4,949	5,003	4,918	5,336	4,955	4,967	5,033	5,148	5,227	5,060	0,145	2,867
2	4,300	4,313	4,355	4,325	4,397	4,385	3,864	4,028	4,070	4,226	0,190	4,493
3	4,585	4,640	4,615	4,300	4,422	4,434	5,064	5,161	5,118	4,704	0,326	6,933
4	5,770	5,836	5,883	6,263	6,296	6,336	4,844	6,110	6,356	5,966	0,478	8,014
5	7,530	7,496	7,420	7,047	7,216	7,140	6,436	7,021	7,131	7,160	0,331	4,627
6	3,764	4,264	4,324	7,323	7,299	7,283	6,883	6,694	6,614	6,050	1,480	24,462
7	6,090	6,083	6,056	5,270	5,224	5,250	5,870	5,923	5,910	5,742	0,379	6,594
8	5,870	5,996	6,076	5,870	6,016	5,990	6,030	6,223	6,243	6,035	0,132	2,182
9	5,204	5,237	5,290	7,123	7,182	7,182	7,437	7,411	7,505	6,619	1,040	15,709
10	5,370	5,430	5,457	4,723	4,816	4,969	5,062	6,377	5,020	5,247	0,499	9,509
11	4,671	4,977	5,057	4,824	5,164	5,224	4,770	4,810	4,804	4,922	0,191	3,887
12	9,061	9,422	9,525	5,612	6,796	7,383	6,230	7,517	7,558	7,678	1,398	18,208

Anexo 14. Análisis ANOVA ($p < 0.05$) para los valores de productividad (p) (g/L/h) y biomasa (x) (g/L)

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
x10	Inter- grupos	60,770	11	5,525	7,308	,000
	Intra- grupos	18,143	24	,756		
	Total	78,913	35			
p10	Inter- grupos	,608	11	,055	7,319	,000
	Intra- grupos	,181	24	,008		
	Total	,789	35			
x12	Inter- grupos	34,483	11	3,135	5,248	,000
	Intra- grupos	14,337	24	,597		
	Total	48,820	35			
p12	Inter- grupos	,240	11	,022	5,262	,000
	Intra- grupos	,099	24	,004		
	Total	,339	35			

x10

		N	Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	
HSD de Tukeya	exp 11	3	2,710000					
	10	3	3,380000	3,380000				
	9	3	3,519667	3,519667	3,519667			
	12	3	3,871333	3,871333	3,871333			
	3	3	4,692000	4,692000	4,692000			
	2	3	4,776667	4,776667	4,776667			
	1	3		5,414000	5,414000	5,414000		
	4	3		5,522667	5,522667	5,522667		
	6	3		5,925000	5,925000	5,925000		
	7	3			6,012667	6,012667		
	8	3			6,017000	6,017000		
	5	3				7,339667		
	Sig.			,198	,052	,060	,278	
Duncana	11	3	2,710000					
	10	3	3,380000	3,380000				
	9	3	3,519667	3,519667				
	12	3	3,871333	3,871333	3,871333			
	3	3		4,692000	4,692000	4,692000		
	2	3		4,776667	4,776667	4,776667		
	1	3			5,414000	5,414000		
	4	3				5,522667		
	6	3				5,925000	5,925000	
	7	3				6,012667	6,012667	
	8	3				6,017000	6,017000	
	5	3					7,339667	
	Sig.			,147	,089	,056	,115	,079

p10

		Subconjunto para alfa = 0.05					
exp	N	1	2	3	4	5	
HSD de Tukeya	11	3	,271000				
	10	3	,338000	,338000			
	9	3	,352000	,352000	,352000		
	12	3	,387000	,387000	,387000		
	3	3	,469667	,469667	,469667		
	2	3	,478000	,478000	,478000		
	1	3		,541667	,541667	,541667	
	4	3		,552333	,552333	,552333	
	6	3		,592667	,592667	,592667	
	7	3			,601000	,601000	
	8	3			,601667	,601667	
	5	3				,734000	
	Sig.		,196	,052	,060	,279	
Duncana	11	3	,271000				
	10	3	,338000	,338000			
	9	3	,352000	,352000			
	12	3	,387000	,387000	,387000		
	3	3		,469667	,469667	,469667	
	2	3		,478000	,478000	,478000	
	1	3			,541667	,541667	
	4	3				,552333	
	6	3				,592667	,592667
	7	3				,601000	,601000
	8	3				,601667	,601667
	5	3					,734000
	Sig.		,147	,088	,056	,116	,079

x12

exp		N	Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	
HSD de Tukeya	2	3	4,226333					
	3	3	4,704000	4,704000				
	11	3	4,922000	4,922000	4,922000			
	1	3	5,059667	5,059667	5,059667			
	10	3	5,247000	5,247000	5,247000			
	7	3	5,741667	5,741667	5,741667	5,741667		
	4	3	5,966000	5,966000	5,966000	5,966000		
	8	3	6,035000	6,035000	6,035000	6,035000		
	6	3	6,050000	6,050000	6,050000	6,050000		
	9	3		6,619000	6,619000	6,619000		
	5	3			7,159667	7,159667		
	12	3				7,678000		
	Sig.			,206	,159	,057	,149	
Duncana	2	3	4,226333					
	3	3	4,704000	4,704000				
	11	3	4,922000	4,922000				
	1	3	5,059667	5,059667				
	10	3	5,247000	5,247000	5,247000			
	7	3		5,741667	5,741667	5,741667		
	4	3		5,966000	5,966000	5,966000		
	8	3		6,035000	6,035000	6,035000		
	6	3		6,050000	6,050000	6,050000		
	9	3			6,619000	6,619000	6,619000	6,619000
	5	3				7,159667	7,159667	7,159667
	12	3					7,678000	7,678000
	Sig.			,160	,076	,065	,057	,125

Anexo 15. Análisis estadístico, prueba t – student para LOG RECuento EN CÁMARA

t-test (Sigmaplot 12)

Data source: Data 1 in Análisis_Estadístico

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,227)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,675)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Melaza	3	0	6,944	0,0403	0,0232
Medio 5	3	0	6,914	0,0199	0,0115

Difference 0,0296

t = 1,140 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0,0425 to 0,102

Two-tailed P-value = 0,318

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0,318).

One-tailed P-value = 0,159

The sample mean of group Melaza does not exceed the sample mean of the group Medio 5 by an amount great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability. The hypothesis that the population mean of group Medio 5 is greater than or equal to the population mean of group Melaza cannot be rejected. (P = 0,159).

Power of performed two-tailed test with alpha = 0,050: 0,144

The power of the performed test (0,144) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Power of performed one-tailed test with alpha = 0,050: 0,245

The power of the performed test (0,245) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Anexo 16. Análisis estadístico, prueba t – student para PRODUCTIVIDAD Cél/mL/h

t-test (Sigmaplot 12)

Data source: Data 2 in Análisis_Estadístico

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,227)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,675)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Melaza	3	0	0,579	0,00336	0,00194
Medio 5	3	0	0,576	0,00166	0,000959

Difference 0,00246

t = 1,140 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: -0,00354 to 0,00847

Two-tailed P-value = 0,318

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0,318).

One-tailed P-value = 0,159

The sample mean of group Melaza does not exceed the sample mean of the group Medio 5 by an amount great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability. The hypothesis that the population mean of group Medio 5 is greater than or equal to the population mean of group Melaza cannot be rejected. (P = 0,159).

Power of performed two-tailed test with alpha = 0,050: 0,144

The power of the performed test (0,144) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Power of performed one-tailed test with alpha = 0,050: 0,245

The power of the performed test (0,245) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

Anexo 17. Análisis estadístico, prueba t – student para pH

t-test (Sigma Plot 12)

Data source: Data 3 in Análisis_Estadístico

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,719)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,451)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Melaza	3	0	5,329	0,0352	0,0203
Medio 5	3	0	4,884	0,0782	0,0451

Difference 0,445

t = 8,988 with 4 degrees of freedom.

95 percent two-tailed confidence interval for difference of means: 0,308 to 0,582

Two-tailed P-value = 0,000848

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = <0,001).

One-tailed P-value = 0,000424

The sample mean of group Melaza exceeds the sample mean of group Medio 5 by an amount that is greater than would be expected by chance, rejecting the hypothesis that the population mean of group Medio 5 is greater than or equal to the population mean of group Melaza. (P = <0,001).

Power of performed two-tailed test with alpha = 0,050: 1,000

Power of performed one-tailed test with alpha = 0,050: 1,000