



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ADECUADO
PARA LA MAGNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
Saccharomyces cerevisiae (CE-1118) Y LIOFILIZACIÓN DEL
PRODUCTO OBTENIDO CON FINES COMERCIALES**

Trabajo de titulación para optar el grado académico de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: COLCHA LEÓN MARÍA LORENA
MORILLO BRITO SILVIA MARCELA

TUTOR: Ing. JUAN CARLOS GONZÁLEZ

Riobamba-Ecuador

2016

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ADECUADO PARA LA MAGNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* (CE-1118) Y LIOFILIZACIÓN DEL PRODUCTO OBTENIDO COM FINES COMERCIALES**, de responsabilidad de las señoritas María Lorena Colcha León y Silvia Marcela Morillo Brito, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Ing. Juan González

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Ing. Sofía Godoy

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DE TITULACIÓN

Nosotras, María Lorena Colcha León y Silvia Marcela Morillo Brito somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

María Lorena Colcha León

Silvia Marcela Morillo Brito

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotras María Lorena Colcha León y Silvia Marcela Morillo Brito, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados

Como autoras, asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba, 04 de Agosto de 2016

María Lorena Colcha León,

Cedula de Identidad: 060449113-4

Silvia Marcela Morillo Brito,

Cedula de Identidad: 060392000-0

DEDICATORIA

A mis padres Juan y Eva, por todo el esfuerzo y sacrificio que han realizado para llegar a cumplir esta meta que a pesar de todas las adversidades y tropiezos nunca dejaron de estar a mi lado apoyándome.

A mis hermanas Verónica y Miriam que son un ejemplo de sacrificio y responsabilidad a mis hermanos Juan y Denis que son un apoyo en los momentos cuando más se los necesita. A Celeste Jara porque ella lo es TODO.

María Lorena

A mi Familia y en especial a mi madre Ruth Neliza Brito Tapia, quienes con su paciencia y amor supieron motivarme a seguir con los retos que se presentan en la vida, entendiendo que el ser justo, recto y responsables son las más grandes virtudes que uno puede tener.

Silvia Marcela

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a nuestro Dios por darnos unos padres luchadores y trabajadores quienes supieron sacarnos adelante, por todo el sacrificio realizado día a día para darnos un buen futuro.

A nuestros profesores por brindarnos sus conocimientos que hicieron posible esta investigación y sobre todo a la Msc. Anita Cunachi y al Ing. Rigoberto Mancheno por el apoyo dado les quedamos enormemente agradecidas.

María Lorena

A mi Señor Dios y por darme la fuerza y la inteligencia suficiente que necesite para poder seguir adelante con mi carrera.

A mi esposo Christian Logroño por su apoyo incondicional, el cual me motivo a seguir adelante con el desarrollo de mi trabajo y no me dejó caer ante las adversidades.

A mi tutor el Ing. Juan Carlos González, la Dra. Játiva y sobre todo a la Msc. Anita Cunachi y al Ing. Rigoberto Mancheno por brindarme apoyo con sus conocimientos necesarios y ayudarme a formarme como una profesional

Silvia Marcela

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xv
ABSTRAC	xvi
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
CAPITULO I	
1.MARCO TEÓRICO	
1.1. Antecedentes	3
1.2.2. Proceso discontinuo (en batch)	6
1.2.3. Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento.	6
1.2.4. Medios de cultivo.....	7
1.2.5. Principios generales y estrategias de diseño.....	7
1.2.6. Evaluación de la biomasa.....	8
1.2.7. Medicago sativa - Alfalfa.....	8
1.2.8. Melaza.....	9
1.2.9. Liofilización	10
CAPITULO II	
2.PARTE EXPERIMENTAL	
2. Lugar de estudio.....	12
2.1. Macro localización	13
2.2. Marco metodológico	13
2.3. Determinación de medios de cultivo.....	14
2.3.1. Medio de cultivo m-Green	15
2.3.2. Medio de cultivo m - Green + Nitrato de Amonio	16
2.3.3. Medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio.....	17
2.3.4. Medio de cultivo YPD + antibiótico	18
2.3.5. Medio de cultivo YPD + fosfato de Monopotásico.....	19
2.3.6. Medio de cultivo YPD + Fosfato Monopotásico + nitrato de amonio	20
2.3.7. Medio de cultivo básico con y sin peptona	21
2.3.9. Conteo de levaduras y medición	28
2.3.10. Identificación microscópica de la colonia ce 1118	29

2.3.11. Preparación de levadura seca	29
2.3.12. Determinación de las características físicas y biológicas de las levaduras reproducidas	30
2.4. Procedimiento liofilización CE 1118	31

CAPITULO III

3.LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Resultados y discusión	32
3.1.1. Medio de cultivo m-Green con y sin nitrato de amonio	32
3.1.2. Medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio	32
3.1.3. Medio de cultivo YPD + antibiótico	33
3.1.4. Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico	33
3.1.5. Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico + nitrato de amonio	34
3.1.6. Medio de cultivo básico	34
3.1.7. Medio de cultivo básico con y sin peptona	34
3.1.8. Conteo de las levaduras de los caldos con y sin peptona a las 24 h	35
3.1.9. Conteo de colonias de levaduras	36
3.1.10. Registró de colonias levaduras	37
3.1.11. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de melaza	37
3.1.12. Cuantificación de levaduras con las diferentes concentraciones de melaza y glucosa .	38
3.1.13. Rendimiento de las levaduras.....	44
Conclusiones	45
Recomendaciones.....	46
Bibliografía	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Ubicación Cartográfica de la FRNC LB.....	13
Tabla 2-2: Formulación del m-Green.....	15
Tabla 3-2: Formulación del m - Green + Nitrato de Amonio	16
Tabla 4-2: Formulación del YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio	17
Tabla 5-2: Formulación del YPD + antibiótico.....	18
Tabla 6-2: Formulación del YPD + fosfato de Monopotásico	19
Tabla 7-2: Formulación del YPD + fosfato de Monopotásico+ nitrato de amonio.....	20
Tabla 8-2: Diferentes concentraciones de melaza y una de glucosa	25
Tabla 9-2: Determinación de grados °Brix de melaza	25
Tabla 10-2: Diferentes concentraciones de melaza y una de glucosa	25
Tabla 1-3: Formulación Medio de cultivo básico Con y Sin Peptona.....	35
Tabla 2 -3: Cuantificación del número de células de levadura con y Sin Peptona	35
Tabla 3-3: Cuantificación del número de células de levadura Con y Sin Peptona a diferentes horas.....	35
Tabla 4-3: Conteo de colonias de levaduras.....	36
Tabla 5-3: Registro de colonias de levaduras inoculado 100 µl	37
Tabla 6-3: Grados °Brix y pH en diferentes concentraciones de melaza.....	38
Tabla 7-3: Cuantificación de levaduras con 200g de melaza.....	38
Tabla 8-3: Cuantificación de levaduras con 300g de melaza.....	39
Tabla 9-3: Cuantificación de levaduras con 400g de melaza.....	41
Tabla 10-3: Cuantificación de levaduras con 800g de melaza.....	42
Tabla 11-3: Rendimiento de levaduras	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Forma de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
Figura 2-1 : Esquema del ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 3-1: <i>Medicago sativa</i> – Alfalfa	9
Figura 4-1: Fases de liofilización.....	10
Figura 1-2 : ESPOCH – FRN – LCB	12
Figura 2-2: Organigrama de la Metodología.....	11
Figura 3-2: Cálculo del Inóculo	32
Figura 1-3: Medio de cultivo m-Green con y sin nitrato de amonio.....	32
Figura 2-3: Medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio.....	32
Figura 3-3: Medio de cultivo YPD + antibiótico	33
Figura 4-3: Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico	33
Figura 5-3: Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico + nitrato de amonio	34
Figura 6-3: Conteo de levaduras con Peptona.....	36
Figura 7-3: Conteo de levaduras sin Peptona.....	32
Figura 8-3: Conteo de colonias de levaduras	33
Figura 9-3: Registro de colonias de levaduras inoculado 100 µl	37
Figura 10-3: Relación Tiempo vs Población.....	39
Figura 11-3: Relación Brix vs Población	39
Figura 12-3: Relación Tiempo vs Población.....	40
Figura 13-3: Relación °Brix vs Población	41
Figura 14-3: Relación Tiempo vs Población.....	41
Figura 15-3: Relación Brix vs Población	42
Figura 15-3: Relación Brix vs Población	42
Figura 16-3: Relación Tiempo vs Población.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Procedimiento de la elaboración del medio de cultivo para la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CE1118).....	49
Anexo B: Conteo de levaduras a las 45 horas.....	52
Anexo C: Conteo de levaduras a las 105 horas.....	52
Anexo D: Pruebas °Brix medio de cultivo 108 hora.....	53
Anexo E: Conteo de levaduras y medición de los grados °Brix a las 133 horas.....	53
Anexo F: Conteo de levaduras y medición de grados °Brix a las 154 horas.....	53
Anexo G : Conteo de células y medición de grados °Brix a las 181 horas.....	54
Anexo H: Conteo y medición de los grados °Brix 203 horas.....	54
Anexo I: Medición de grados °Brix y conteo de levadura 271 horas.....	55
Anexo J: Medición de grados °Brix y conteo de levaduras 291 horas.....	55
Anexo K: Medición de grados °Brix y conteo de levaduras.....	56
Anexo L: Medición de grados °Brix y conteo de levaduras.....	56
Anexo M: Medición de grados °Brix de la glucosa y c4 = 800gr.....	56
Anexo N: Conteo de levaduras y medición de grados °Brix.....	56
Anexo O: Volumen final que se obtuvo de medio de cultivo con las diluciones de agua destilada estéril y solución salina 5%.....	57
Anexo P: Medición de °Brix y conteo de levaduras de concentración de melaza 800gr 278 horas.....	57
Anexo Q: Medición de grados °Brix y conteo de células concentración 800gr melaza 298 horas.....	57
Anexo R: Medición de grados °Brix y conteo de células concentración 800gr melaza 326 horas.....	57
Anexo S: Medición de grados °Brix y conteo de células concentración 800gr melaza horas 57	57

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la “Determinación del medio de cultivo adecuado para la magnificación de la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (CE 1118 y Liofilización del producto obtenido con fines comerciales”. Se formularon diferentes medios de cultivo con varias dosificaciones de nutrientes, desechándose algunos por no favorecer el crecimiento de las levaduras, sin embargo la formulación en la cual se utilizó la melaza (fuente de azúcar) y la alfalfa (fuente de micro elementos y vitaminas naturales) fue la más eficiente para la obtención de una gran masa de levaduras. Las Unidades formadoras de colonias (UFC) y masa correspondiente fue obtenida mediante el conteo utilizando la cámara de Neubauer, alcanzó un valor de 7.63 (log10) de UFC/ml, además se determinó la fuente limitante para el crecimiento de las mismas que fue el azúcar, siendo a 18 °Brix, y 25°C +/- 1°C durante 181 horas de incubación las condiciones óptimas para alcanzar una masa considerable de levaduras. La liofilización como medio de preservación de las levaduras, favorece al mantenimiento de la viabilidad, el olor y el sabor característico de las mismas, ya que no hay daño por efecto del calor en el producto final y cuándo se rehidrata mantiene la mayor parte de su peso original. A partir de una masa de 70.54 g, se sometió al secado a 35°C durante 72 horas obteniéndose como producto final 39.88g de levadura semi seca y 29.81g de levadura seca, es decir con un rendimiento de 17.17% que se considera bueno. Se recomienda obtener la masa de *Saccharomyces* con la misma formulación del medio de cultivo, pero manejando otros factores que pudieran influenciar en el crecimiento y reproducción como la temperatura, incidencia de luz, y otras fuentes de nutrientes con mayores contenidos de fosforo y nitrógeno.

Palabras claves: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL>, <REPRODUCCIÓN DE LEVADURAS VINÍCOLA>, <MICROORGANISMO (*Saccharomyces cerevisiae*)>, <MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO>, <LIOFILIZACIÓN>.

ABSTRAC

This research was targeted the determining the appropriate culture medium for the magnification of the production of *Saccharomyces cerevisiae* (CE1118 and freeze-drying of nutrients, discarding some not favor the growth of yeasts, however the formulation witch was used molasses (sugar source) and alfalfa (fluent of micro elements and vitamins) was the most efficient for obtain a yeast dough. The colony forming units (CFU) and corresponding mass was obtained by counting using the camera Nuebauer reached a value of 7.63 (log 10) CFU / ml, along the limiting source for the growth of these was the sugar was determined, being 18°C Brix and 25°C +/- 1°C for 181 hours of incubation the optimal conditions to achieve a considerable mass of yeast. The freeze drying as a means of preserving yeast, favors the maintenance of the viability, the smell or characteristic taste of the same, as there is no damage from the effect of heat on the final product and when rehydrated keeps most of their original weight. From a mass of 70.54g, subjected to drying at 35°C for 72 hours obtaining as a final product 39.88g of semi dry yeast and 29.81g of dry yeast, ie a yield of 17.17% it is considered good. It is recommended obtain the mass of *Saccharomyces* with the same formulation of the culture medium, but managing other factors that could influence the growth and reproduction as temperature, incidence of light, and other sources of nutrients with higher content of phosphorus and nitrogen.

Keywords:

<SCIENCE TECHNOLOGY AND ENGINEERING>, <ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY>, <REPRODUCTION OF YEAST VINICOLA>, <MICROORGANISMS (*Saccharomyces cerevisiae*)>, <LIQUID CULTURE MEDIUM>, FREEZE DRYING>.

INTRODUCCIÓN

Los procesos biotecnológicos permiten la obtención de biomasa de determinado microorganismo con el fin de utilizarse como inóculo industrial. Debido a que este proceso se basa en la optimización del rendimiento de células viables con una actividad biológica definida y con buenas características de supervivencia.

La supervivencia de los microorganismos depende de varios factores entre ellos, la formulación adecuada de un medio de cultivo que favorezca el crecimiento y optimice las rutas metabólicas del microorganismo en la asimilación del sustrato. La producción se puede obtener mediante un proceso discontinuo (batch), para obtener levaduras de forma definida, viables y a bajo costo.

En el proceso de cultivo batch se da por un procedimiento espontáneo cerrado, que culmina cuando se agotan los nutrientes limitantes de crecimiento, o cuando las condiciones de medio impiden el desarrollo del microorganismo, además la utilización de sustrato como la formación de productos pueden expresarse por un balance de masas.

En el presente caso para la producción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han propuesto los siguientes objetivos: Determinar las cantidades adecuadas de melaza, y contenidos de nitrógeno, calcio, magnesio y hierro en la composición del medio. Determinar el tiempo de reproducción de *Saccharomyces cerevisiae* (CE-1118). Determinar la viabilidad de la producción de levadura vinícola. Secar la levadura enológica y empacar al vacío.

Para conservar células o productos que pueden descomponerse es necesario liofilizar en el presente caso las levaduras son células con vida latente que requieren baja humedad, mínimo metabolismo y una probabilidad de mantenerlas más tiempo es la liofilización

En la vinilogía las levaduras primero deben ser activadas colocando en agua tibia hasta su activación que se comprueba, pasado un tiempo por la producción de burbujas de anhídrido carbónico parámetro que determina si son viables después de cada proceso de purificación o secado de levaduras.

El proceso de conservación de las levaduras estará determinado por la viabilidad de las mismas en contenedores como sachet, frascos plásticos, dependiendo de la cantidad a embazarse.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente en el país no existe producción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CE1118) utilizada masivamente para la fermentación vinícola, razón por la cual ha sido necesaria la importación de las mismas, ocasionando altos costos para su abastecimiento y una eventual salida de divisas para el estado, para contrarrestar este efecto negativo se propone producir microorganismos a nivel de laboratorio que posteriormente pueden ser llevados escala industrial. El Ministerio de Industrias y Productividad (MIPRO) considera al vino de frutas como un producto de larga vida de anaquel, actividad practicada por organizaciones agrícolas y campesinas como emprendimiento por lo que existe un nicho de mercado creciente.

En general para la producción masiva de levaduras vinícolas se han utilizado medios de cultivo líquidos que requieren de hidratos de carbono, nitrógeno, fosforo y micro nutrientes, todas las fuentes de los mismos se encuentran en abundancia y disponibles en el país, como es el caso de la más de utilizar la melaza residual.

Es importante mencionar que la industria azucarera (Ingenio Valdez) produce 20.4 toneladas de melaza por hora, la melaza es un sobrante químico derivado del procesamiento de la caña de azúcar, el mismo que no sirve para formar cristales de azúcar, ya que es el residuo. (Mónica Florencia 2003) que puede utilizarse como una fuente orgánica que contiene macro y micro nutrientes y goza de amplia disponibilidad.

La levadura seca liofilizada tiene como ventaja obtener un producto con una larga vida útil y puede expendirse en diferentes presentaciones y envases de diversos materiales (plástico, aluminio, cartón, etc.). Ya que la liofilización ayuda a la conservación de todas las características del microorganismos.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Filogenéticamente de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que la especie en su conjunto consta de dos poblaciones, domésticos y salvaje (Michael T. 1999, pp 811). Algunas características de esta levadura que forman parte de su adaptación son el hecho de que pueda metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por vía respiratoria como por vía fermentativa, y de crecer en condiciones aerobias o anaerobias (González, 2007, <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16>).

Las fuentes de nutrientes juegan un rol fundamental en el comportamiento de la levadura durante la producción de masa microbiana, para el cultivo a escala industrial es necesario conocer los requerimientos nutricionales y diseñar un medio de cultivo óptimo, tomando en cuenta que uno de los nutrientes que se necesita en el método batch es una fuente de carbono (glucosa o derivado de un azúcar), una fuente de nitrógeno, macro y micronutrientes (P, S, K, Mg, Ca).

Para esto se recomienda los medios de cultivo líquidos donde se de una agitación, para luego poder observar el depósito de la levadura (González Lázaro Miriam, 2014 http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000802.pdf). Para la producción de levadura como material celular requiere la presencia de oxígeno para alcanzar una producción máxima, y se utilizan la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CE1118).

Requerimientos para la producción de células de levadura los materiales utilizados en el medio contiene melaza como ingrediente principal que es la fuente de carbono y de energía. También contiene minerales, vitaminas y aminoácidos que son utilizados por la levadura. Se completan para el medio del crecimiento de levadura al añadir ácido Fosfórico (una fuente de fósforo) y sulfato amónico (una fuente de Azufre y Nitrógeno) El Proceso comienza con el cultivo de reserva de inóculo puro que va seguido de varias etapas intermedias en las que se va

incrementando el inóculo hasta alcanzar una cantidad adecuada .Al principio del proceso solo se añade una pequeña cantidad de melaza y a medida que el cultivo de la levadura crece y consume este azúcar, se va añadiendo más melaza de manera controlada. Esto evita que se produzca un exceso de azúcar y que el proceso metabólico se transforme en fermentación, lo cual conllevaría aún menor rendimiento energético,

Finalizado el período de crecimiento, las células de levadura se recuperan del caldo por centrifugación y se lavan con agua hasta que se adopta un color claro La levadura que se comercializa en estado seco para panadería se llama levadura seca activa. Las células de levaduras lavadas se mezclan y se secan a vacío hasta que están secas. A continuación se envasa en cierres herméticos como cajas de cartón a veces es necesaria una atmosfera de nitrógeno que favorece la conservación del producto por periodos largos (Michael T. et al., 1999 pp. 172-175).

1.2. Marco conceptual

1.2.1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha comercializado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas, jugando un papel fundamental en la transformación del jugo de frutas para vino resaltando principalmente la manifestación de los aromas de las variedades utilizadas y aportando aromas de fermentación que pueden enriquecer y resaltar el vino obtenido en concentración. (Alicia González y Lourdes Valenzuela. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16>).

Las levaduras vinícolas realizan el proceso es consumir azúcares para producir dos productos importantes: CO₂, que es dióxido de carbono, y etanol. Además de esto, produce otros productos químicos en pequeñas cantidades, que es lo que le da a las diferentes bebidas sus diferentes sabores tan peculiares dependiendo de la levadura usada. (Stefanini, 2012 <http://eprints.sim.ucm.es/15170/1/T33738.pdf>).

Características generales

Nombre científico: *Saccharomyces cerevisiae*

Clasificación superior: *Saccharomyces*

Categoría: Especie

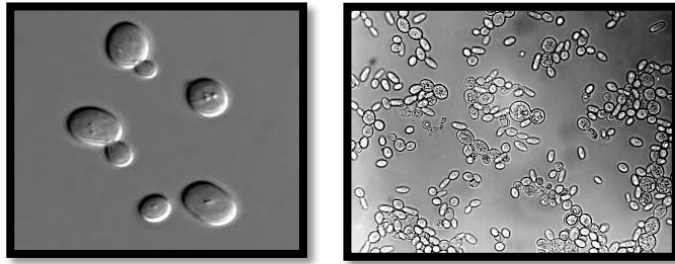


Figura 1.1-1: Forma de la *Saccharomyces cerevisiae*
Fuente: LCB.FRN. 1000X 2016.

- ✓ Son cilíndricos, esféricos u ovals. La mayoría son unicelulares pero algunas pueden formar filamentos como la *Candida albicans*. Se dividen asexualmente por gemación o fisión y algunos géneros presentan un ciclo sexual mediante conjugación (*Saccharomyces cerevisiae*).
- ✓ Son típicos de hábitat con azúcares, frutos, flores, cortezas de árboles.
- ✓ Hay especies simbiotes con animales y también patógenas para el hombre
- ✓ Algunas tienen gran importancia industrial: obtención de vino, cerveza y alcohol. (Martindale. 1993 pp. 569-575).

Ciclo biológico de *Saccharomyces cerevisiae*.

El ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae* alterna dos fases, una haploide y otra diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo.

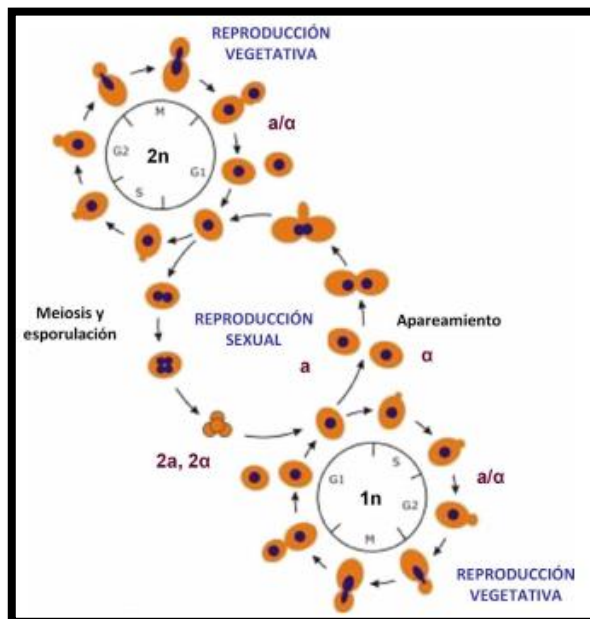


Figura 2-1 : Esquema del ciclo biológico de *S. cerevisiae*
Fuente: Patricia Arias López, 2012

La pared celular fúngica es una envoltura rígida, situada entre la membrana plasmática y el medio externo, esencial para proteger a la célula de las condiciones ambientales, no siempre favorables, preservando así la integridad celular, evitar la lisis celular debido a las diferencias de presión osmótica extra e intracelular.

En los procesos de biogénesis de la pared y contribuye, junto con la presencia de grupos fosfato cargados negativamente, a la retención de agua.

La pared celular, a pesar de su rigidez, no es una estructura estática sino dinámica, ya que necesita adaptarse a los diferentes procesos morfo-genéticos paralelos al ciclo vital de la levadura tales como la división, esporulación o crecimiento pseudohifal.

La pared celular de *S. cerevisiae* representa el 30% del peso seco de la célula y está constituida principalmente por polisacáridos (85%) y proteínas (15%).

El pH óptimo para el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* es ligeramente ácido. La alcalinización del medio provoca cambios en la presencia de distintos nutrientes (fosfato y otros cationes) y modifica las cargas negativas de las proteínas. (Medigan et al., 1995 pp811-841).

1.2.2. Proceso discontinuo (en batch)

Una fermentación batch es considerado como un sistema cerrado ya que al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo (*S. cerevisiae*), permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación, a lo largo de toda la fermentación no se añade nada excepto oxígeno en forma de aire. (Martindale. 1993 pp 569-575)

La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa combina generalmente como resultado de metabolismo de las levaduras observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria, y fase de muerte. (Martindale. 1993 pp 569-575)

Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento.

Los microorganismos son capaces de responder a variaciones en los niveles de nutrientes, y particularmente a la limitación en nutrientes o naturaleza química, física de su ambiente controlando parámetros como: pH, temperatura, nivel de oxígeno. (Martindale. 1993 pp 569-575)

pH.- Las levaduras crecen en un pH óptimo que está en el rango de 5.5 a 8.5, pero durante el crecimiento las levaduras liberan sustancias que ellas producen cambiando el pH original. En tal virtud es necesario agregar un ácido o una base cuando han existido cambios en el pH del medio para mantener el rango ideal de producción de las levaduras. (Martindale. 1993 pp 569-575)

Temperatura.- La temperatura es un factor influyente decisivo considerando que hay un valor óptimo para el desarrollo bajo este hay una disminución de la producción y sobre el valor óptimo se puede llegar al estrés de las células que como mecanismo de defensa produciendo proteasas celulares ocasionan una disminución en el rendimiento de los productos proteicos. Una alternativa en los procesos industriales es la protección con camisas de agua que recubren los fermentadores. (Martindale. 1993 pp 569-575)

Nivel de oxígeno.- En los medios de cultivo el oxígeno es un elemento indispensable para el ciclo reproductivo de las levaduras el mismo que se proporciona por aireadores y en el proceso de respiración se conoce que el oxígeno es transformado por las levaduras por CO₂. En agua pura una solución saturada de oxígeno es de 9 mg/L considerando que el medio de cultivo a más de agua contiene hidratos de carbono y vitaminas la concentración de oxígeno es menor por lo cual se debe administrar oxígeno. (Martindale. 1993 pp 569-575).

1.2.3. Medios de cultivo.

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él. La Gelatina es otro agente solidificante pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias provocan su licuación.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes. (Medina et al., 2012 pp 1-6).

1.2.4. Principios generales y estrategias de diseño

Para hacer crecer, las levaduras requieren de una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos; los mismos que se necesitan en dos niveles en macro y micro. Generalmente, las levaduras en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y

carbohidratos suministradas por el medio de cultivo, sin embargo también exigen una cantidad de sustancias orgánicas mínimas y que son muy activas en el crecimiento

Un medio basal incluye macro elementos (Carbono, Nitrógeno, Oxígeno, Fosforo, Potasio, Azufre, Calcio y Magnesio) y los micro elementos (Boro, Zinc, Manganeso, Cobre, Molibdeno, Hierro y Cloro) (Vagabov. 2000 pp 354).

1.2.5. Evaluación de la biomasa

Viabilidad.- La viabilidad de la *S. cerevisiae* se puede determinar mediante técnicas de proliferación celular o recuento en placa y tinción con azul de metileno en tampón citrato. La prueba de viabilidad con azul de metileno se realiza por triplicado, en el cuál arrojará un valor promedio de 80% de células viables. (Krokorian, 1997 pp 349-354)

Recuento de levaduras en placa con Agar.- Se realiza en placas incubadas con las diluciones 10-6, 10-7 y 10-8. Para el cual da un promedio de dicho recuento en UFC/g de biomasa húmeda, y para la levadura comercial se debe reportar UFC/g de levadura seca. (Krokorian, 1997 pp 349-354).

Graduación alcohólica.- Parte de la concentración de azúcares totales, que incluye entre otros la glucosa y fructosa propia del jugo más la sacarosa agregada para obtener el mosto, las levaduras necesitan 17g de azúcar para producir 1° de alcohol. (Aleixandre, 1999).

Recuento microscópico UFC.- El recuento microscópico se lo realiza de los cultivos que se obtienen, en donde se demuestra, que algunos de los macro, micro nutrientes y factores de crecimiento son indispensables para el desarrollo de las levaduras. (Aleixandre, 1999 pp. 811-841).

1.2.6. Medicago sativa – Alfalfa

Nombre científico: *Medicago sativa*

Categoría: Especie

Clasificación superior: Medicago



Figura 3-1: Medicago sativa – Alfalfa
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Su nombre científico deriva de Medea (Medicago) antigua ciudad del norte de África mientras que sativa significa cultivada, y su nombre vulgar proviene de la palabra árabe alfasasat que quiere decir “padre de todos los padres (Martindale, 1993 pp. 569-575).

Contenido de nutrientes de la alfalfa

La alfalfa es muy rica en hierro, calcio y fósforo, teniendo como uno de los notables beneficios su fuente de vitamina D, además contiene niveles llenos de poder de la vitamina B12 (Rodríguez, 1993 pp. 569-575).

Los 100 g de brotes de alfalfa tierna contiene 52 calorías, 82,7 de la mezcla de 6 g de proteína, 0,4 de grasa, 9.5 de carbohidratos totales, 3.1 de fibra, 1.4 g de ceniza, 12 mg de calcio, 51 mg de fósforo, 5.4 mg de He, 34.10 IU de vitamina A, 0,13 mg de tiamina, 0,14 de riboflabina, 0.5 mg de miosina y 162 mg de ácido ascórbico

Las hojas verdes de alfalfa reportan un contenido del 80 % de la mezcla formada por 5.2 de proteína , 0,9 de grasa, 3,5 g de fibra y 2,4 g de ceniza, además la alfalfa contiene saponinas considerada como antiescorbútica que produce apetito, bactericida, cardiotónica, cianogenética, depurativa, diurética, emenagoga (Handbook of medicinal herbs James A. Duke 1976 CRC, pp 575).

1.2.7. Melaza

La melaza tiene un alto contenido de minerales y es mejor que el azúcar refinado, debido a que eliminan todas las propiedades beneficiosas. Tiene un color oscuro, porque contiene una gran cantidad de azúcar de caña. La melaza orgánica tiene propiedades beneficiosas de calcio, magnesio, hierro, además contiene gran cantidad de hidratos de carbono que beneficia los niveles energéticos del organismo.

1.2.8. Liofilización

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. La liofilización es el proceso más suave para secar productos y es el mejor método para secar compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa. El proceso de liofilización se realiza a vacío y a baja temperatura y así, por ejemplo, es posible evitar la desnaturalización de las proteínas. Los alimentos y los materiales biológicos tales como células, tejidos, bacterias, levaduras y vacunas se convierten en productos secos, evitando el paso por su fase líquida, y en consecuencia los cambios enzimáticos, biológicos y químicos. En este apartado nos centraremos en el liofilizador de laboratorio, que se utiliza para liofilizar muestras pequeñas de productos químicos. (GIDOLQUIM, <http://www.ub.edu/talq/es/node/261>, 2014).

Fundamento de la técnica

La liofilización se basa en el fenómeno físico de la sublimación del agua o bien de un disolvente orgánico o de mezclas acuoso-orgánicas que estén congeladas; el disolvente congelado sublima directamente a vapor sin pasar por el estado líquido. Habitualmente, cuando se trabaja con alimentos, proteínas o material biológico, el disolvente a eliminar es agua, con el objetivo de obtener un producto seco, que cuando se le vuelve a añadir agua o disolvente, presente las mismas características que el producto original (forma, color, aroma, sabor y textura). La liofilización reduce las pérdidas de calidad debidas al deterioro de la muestra por reacciones químicas. (GIDOLQUIM, <http://www.ub.edu/talq/es/node/261>, 2014).



Figura 4-1: Fases de liofilización
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Proceso de liofilización puede describirse en cuatro fases:

Congelación: Se debe congelar rápidamente el producto a una temperatura por debajo de su punto eutéctico. (Punto eutéctico: la temperatura más baja a la que puede fundir una mezcla de sólidos con una composición dada)

Tratamiento a vacío: Es preciso eliminar el aire y otros vapores no condensables de la cámara a fin de facilitar la migración del vapor

Calentamiento: Habitualmente se trabaja a temperatura ambiente, pero si es necesario, se puede calentar la muestra congelada con mucho cuidado para acelerar el proceso de secado. Esta fase no es conveniente si los productos pueden variar sus propiedades por encima de la temperatura ambiente.

Condensación (o sublimación inversa): Fijación de las moléculas de agua en forma de hielo sobre la superficie del condensador del liofilizador. (GIDOLQUIM, <http://www.ub.edu/talq/es/node/261>, 2014)

CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar de estudio

Fue realizada en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) en la Facultad de Recursos Naturales (FRN) Laboratorio de Ciencias Biológicas (LCB). La muestra de levadura *Saccharomyces cereviceae* (CE 1118) fue proporcionada por el Ing. Rigoberto Mancheno técnico docente del laboratorio de Química de la FRN, que serán utilizadas como inóculo en el medio de cultivo para analizar las proporciones de macro y micro elementos para obtener el mayor rendimiento.

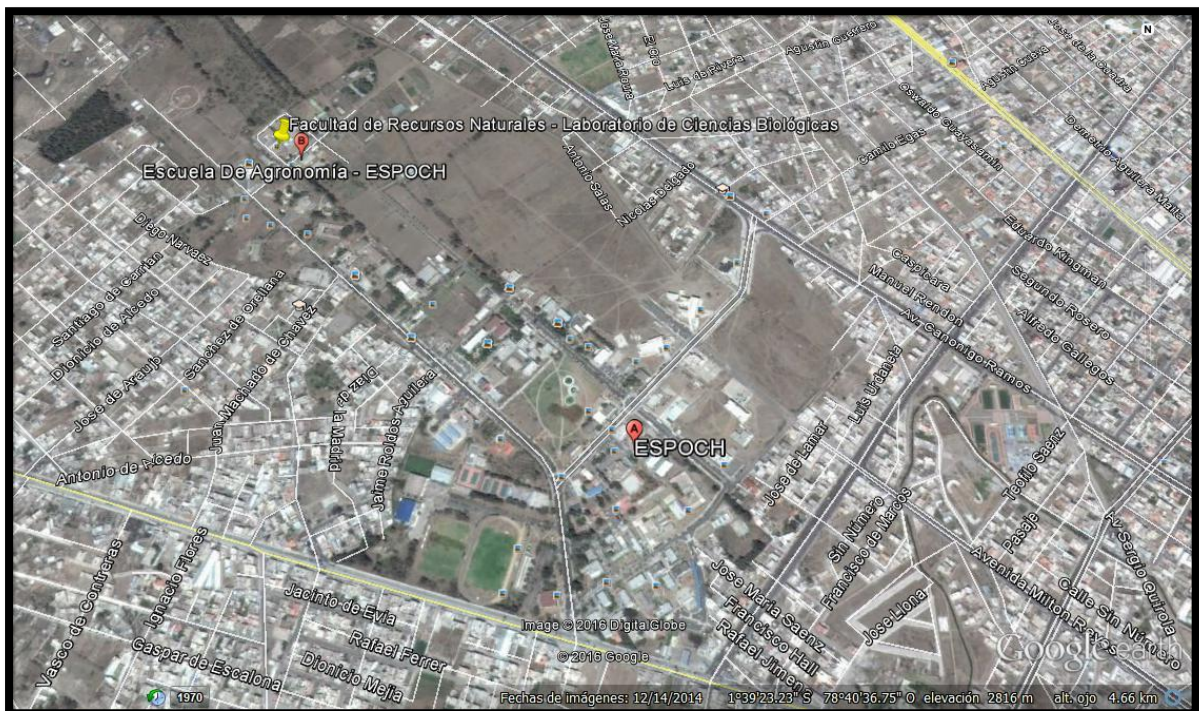


Figura 1-2 : ESPOCH – FRN – LCB
Fuente: Google Earth®, 2016

2.2. Macro localización

Tabla 1-2: Ubicación Cartográfica de la FRNC LB

Ubicación Cartográfica	
PROVINCIA	Chimborazo
CANTÓN	Riobamba
PARROQUIA	Lizarzaburu
DIRECCIÓN	Panamericana Sur km 1 1/2

Fuente: ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Límites territoriales:

La ciudad de Riobamba limita con:

- Al norte: Los cantones de Guano y Penipe
- Al sur: Los cantones de Colta y Guamote
- Al este: Limita con la cantón Chambo
- Al oeste: por las provincias de Bolívar y Guayas.

2.3. Marco metodológico

El marco metodológico contiene la recopilación de información bibliográfica y las modificaciones que se realizaron especialmente en los medios de cultivo hasta obtener el producto deseado que es la levadura *Saccharomyces cereviceae* utilizada en vinilogia.

Los diferentes procesos realizados para reproducir las levaduras vinícolas en el laboratorio están contenidos en las formulaciones y las comprobaciones realizadas por métodos físicos y microscopios.

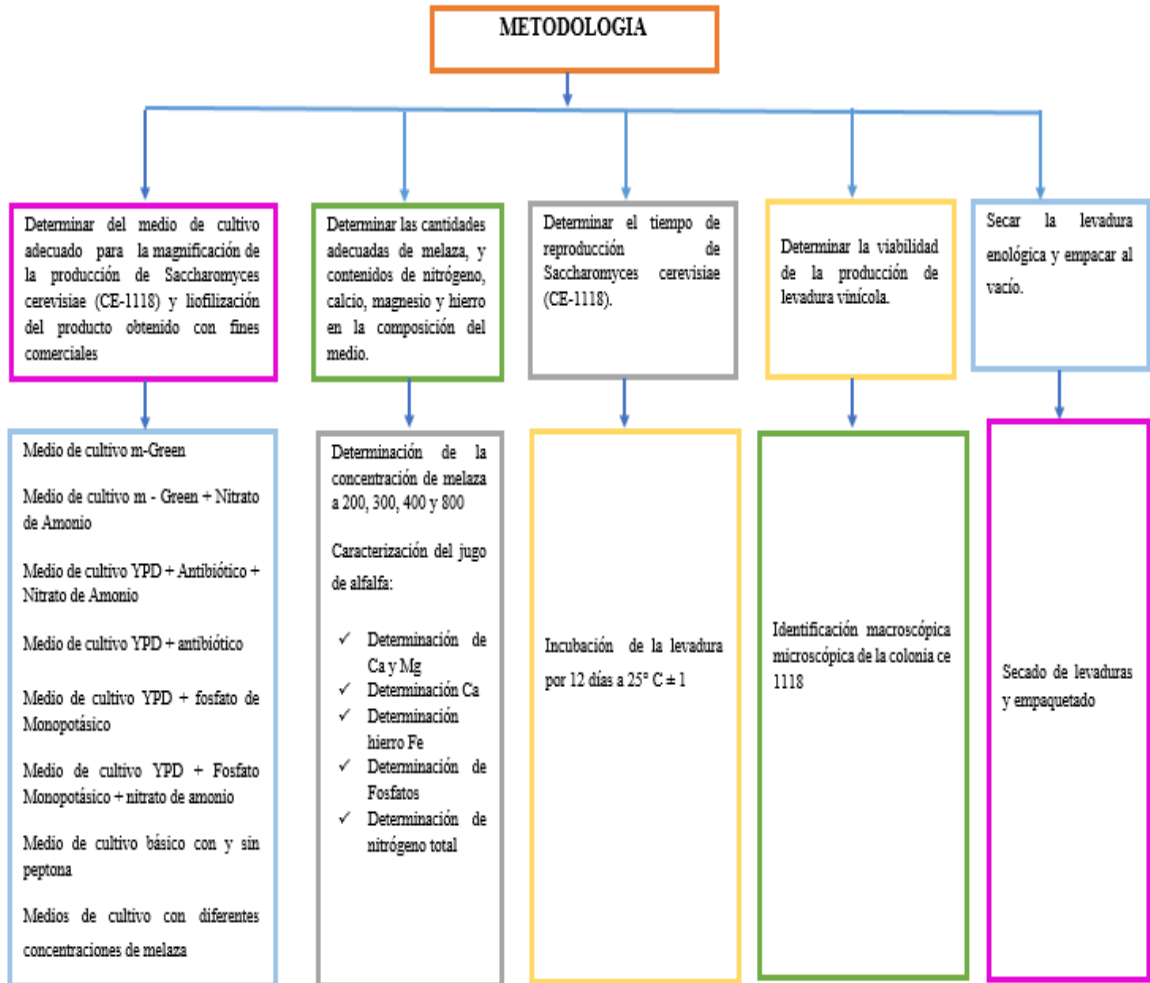


Figura 2.1-2: Organigrama de la metodología
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

2.4. Determinación de medios de cultivo

Preparación de medios de cultivo

Las levaduras son seres vivos mantenidos en estado latente, que necesitan de medios de cultivo líquidos con micro y macro elementos, y las cantidades deben ser específicas para obtener un medio óptimo. Se pesó todos los materiales y materias primas, en el laboratorio que fueron utilizados durante el proceso de reproducción de levadura *Saccharomyces cereviceae*.

2.4.1. Medio de cultivo m-Green

Utilizado para desarrollo de hongos y levaduras reportado en Britania.

Tabla 2-2: Formulación del m-Green

Materiales, Reactivos y Productos	Pesos (g)
Frascos	144.49
Levadura CE 1118	0.9
Peptona	0.5
Fosfato mono Potásico	0.2
Verde bromo cresol	4.0 ml

Fuente: Britania

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

- ✓ Se pesó la peptona y el fosfato mono potásico y se agregó a 100mL de agua, se agita y calienta hasta disolución total.
- ✓ Solución de verde bromo cresol: Se preparó con 99.5mL de agua destilada estéril y 0.5 ml de verde bromo cresol 1M.
- ✓ Solución de levadura: se pesó 0.9 g de levadura y disolvió en 10 mL de agua destilada estéril a 20°C.
- ✓ Solución de melaza: se pesó 1g de melaza y diluyó a 10 mL con agua destilada estéril.

Preparación de cajas Petri con medio de cultivo m - Green

Se colocó 20mL de medio de cultivo preparado en las cajas Petri y por agitación circular se homogeniza el contenido de la misma y se esteriliza por 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Siembra de inóculo

En las cajas Petri esterilizadas se siembran en la cámara de flujo laminar 10 µL de la solución de levadura, homogeniza por agitación circular y deja en estufa microbiológica a 29.3 °C durante 24 horas.

2.4.2. Medio de cultivo m - Green + Nitrato de Amonio

Este medio de cultivo es útil en la determinación de hongos y levaduras.

Tabla 3-2: Formulación del m - Green + Nitrato de Amonio

Materiales, Reactivos y Productos	Pesos (g)
Frascos	144.49
Levadura CE 1118	1.0
Peptona	1.0
Agar	2.0
Nitrato de amonio	1.0

Fuente: Britania

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

- ✓ Se pesó la peptona y el nitrato de amonio y disolvió en 100mL de agua, se agita y calienta hasta disolución total.
- ✓ Solución de levadura: se pesó 1.0 g de levadura y disolvió en 10mL de agua destilada estéril a 20°C.
- ✓ Solución de melaza: se pesó 1g de melaza y diluyó en 10 mL con agua destilada estéril.

Preparación de cajas Petri con medio de cultivo m Green + nitrato de amonio

Se colocó 20mL de medio de cultivo preparado en las cajas Petri y por agitación circular se homogeniza el contenido de la misma y se esteriliza por 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Siembra de inóculo

En las cajas Petri esterilizadas se siembran en la cámara de flujo laminar 10 µL de la solución de levadura, homogeniza por agitación circular y deja en estufa microbiológica a 29.3 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se observa al microscopio si hubo o no crecimiento de levaduras.

2.4.3. Medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio

Tabla 4-2: Formulación del YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio

Materiales, Reactivos y Productos	Pesos (g)
Levadura CE 1118	1
Peptona	1
Agar	2
Nitrato de amonio	0.1
Eritomicina	0.0014
Cloranfenicol	0.006

Fuente: ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

- ✓ Se pesó la peptona, el nitrato de amonio, la Eritomicina y el cloranfenicol y se agregaron a 90mL de agua, se agito y calentó hasta disolución total, completando a un volumen total de 100mL.
- ✓ Solución de levadura: se pesó 1.0 g de levadura y disolvió en 10mL de agua destilada estéril a 20°C.
- ✓ Solución de melaza: se pesó 1g de melaza y diluyó en 10mL con agua destilada estéril.
- ✓ Solución de Eritomicina: pesar 0.0014 g de Eritromicina y disolver en 100mL de agua estéril.
- ✓ Solución de cloranfenicol: pesó 0.006 g de cloranfenicol y disolver en 100mL de agua esterilizada

Preparación de cajas Petri con medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio Se colocó 20mL de medio de cultivo preparado en las cajas Petri y por agitación circular se homogeniza el contenido de la misma y se esteriliza por 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Siembra de inóculo: En las cajas Petri esterilizadas de siembran en la cámara de flujo laminar 10 µL de la solución de levadura, homogeniza por agitación circular y deja en estufa microbiológica a 29.3 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se observa al microscopio si hubo o no crecimiento de levaduras.

Medición de pH: es muy ácido con NaOH se obtiene un pH adecuado para el crecimiento de las levaduras.

Medición Grados °Brix: Se colocó una gota de medio de cultivo preparado en el brixometro, el mismo que necesita de luz natural para su lectura.

2.4.4. Medio de cultivo YPD + antibiótico

Para limitar el desarrollo de bacterias.

Tabla 5-2: Formulación del YPD + antibiótico

Materiales, Reactivos y Productos	Pesos (g)
Frascos	144.26
Levadura CE 1118	1
Peptona	1
Agar	2
Eritromicina	0.0014
Cloranfenicol	0.006

Fuente: ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

- ✓ Se pesó la peptona, la Eritromicina y el cloranfenicol se disolvió en 100mL de agua, se agita y calienta hasta disolución total.
- ✓ Solución de agar: se pesó 2g de agar y disolvió en 100mL de agua estéril, luego se aforó a 200mL.
- ✓ Solución de levadura: se pesó 1.0 g de levadura y disolvió en 100mL de agua destilada estéril a 20°C.
- ✓ Solución de melaza: se pesó 1g de melaza y diluyó a 100mL con agua destilada estéril.
- ✓ Solución de Eritromicina: pesar 0.0014 g de Eritromicina y disolver en 100mL de agua estéril.
- ✓ Solución de cloranfenicol: pesó 0.006 g de cloranfenicol y disolver en 100mL de agua esterilizada.

Preparación de cajas Petri medio de cultivo YPD + antibiótico.-Se colocó 20mL de medio de cultivo preparado en las cajas Petri y por agitación circular se homogenizo el contenido de la misma y se esteriliza por 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Siembra de inóculo.- En las cajas Petri esterilizadas de siembran en la cámara de flujo laminar 10 µL de la solución de levadura, homogenizo por agitación circular y deja en estufa microbiológica a 29.3 °C durante 24 horas.

Medición de pH: es muy ácido y se baja la acides con solución de NaOH 1N hasta obtener un pH adecuado para el crecimiento de las levaduras.

2.4.5. Medio de cultivo YPD + fosfato de Mono potásico

Tabla 6-2: Formulación del YPD + fosfato de Mono potásico

Materiales, Reactivos y Productos	Pesos (g)
Frascos	149.91
Levadura CE 1118	1
Peptona	1
Agar	2
Fosfato mono potásico	0.15
Etanol + agua destilada	100mL

Fuente: ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

- ✓ Se pesó la peptona, el fosfato mono potásico y se midió el etanol los mismos que se llevaron a 100mL de agua, se agita y calienta hasta disolución total.
- ✓ Solución de agar: se pesó 2g de agar y disolvió en 100mL de agua estéril, luego se aforó a 200mL.
- ✓ Solución de levadura: se pesó 1.0 g de levadura y disolvió en 100mL de agua destilada estéril a 20°C.
- ✓ Solución de melaza: se pesó 1g de melaza y diluyó a 100mL con agua destilada estéril.
- ✓ Solución fosfato mono potásico: pesar 0.15 g y disolver en 100mL de agua estéril.
- ✓ Solución etanol + agua destilada: en las siguientes proporciones 98.8 ml (agua): 1.2 ml etanol.

Preparación de cajas Petri medio de cultivo YPD + fosfato de Monopotásico

Se colocó 20 mL de medio de cultivo preparado en las cajas Petri y por agitación circular se homogenizó el contenido de la misma y se esteriliza por 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Siembra de inóculo

En las cajas Petri esterilizadas se siembran en la cámara de flujo laminar 10 µL de la solución de levadura, homogenizo por agitación circular y deja en estufa microbiológica a 29.3 °C durante 24 horas.

Medición de pH: es muy ácido se lleva a un pH de 5.47 con NaOH 1N.

2.4.6. Medio de cultivo YPD + Fosfato Mono potásico + nitrato de amonio

Tabla 7-2: Formulación del YPD + fosfato de Mono potásico + Nitrato de amonio

Materiales, Reactivos y Productos	Pesos (g)
Levadura CE 1118	1
Peptona	1
Agar	2
Fosfato mono potásico	0.15
Etanol + agua destilada	100mL
Nitrato de amonio	0.1

Fuente: ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

- ✓ Se pesó la peptona, el fosfato mono potásico, el nitrato de amonio, se midió el etanol los mismos que se disuelven en 100mL de agua, se agita y calienta hasta disolución total.
- ✓ Solución de agar: se pesó 2g de agar y disolvió en 100mL de agua estéril, luego se aforó a 200mL.
- ✓ Solución de levadura: se pesó 1.0 g de levadura y disolvió en 100mL de agua destilada estéril a 20°C.
- ✓ Solución de melaza: se pesó 1g de melaza y diluyó a 100mL con agua destilada estéril.
- ✓ Solución etanol + agua destilada: la relación fue de 98.8 ml (agua): 1.2 ml etanol.

Preparación de cajas Petri medio de cultivo YPD + Fosfato Mono potásico + nitrato de amonio

Se colocó 20mL de medio de cultivo preparado en las cajas Petri y por agitación circular se homogeniza el contenido de la misma y se esteriliza por 20 minutos en la cámara de flujo laminar.

Siembra de inóculo

En las cajas Petri esterilizadas de siembran en la cámara de flujo laminar 10 µL de la solución de levadura, homogeniza por agitación circular y deja en estufa microbiológica a 29.3 °C durante 24 horas.

Medición de pH: es muy ácido y se baja la acidez a 5.37 con NaOH 1N.

2.4.7. Medio de cultivo básico con y sin peptona

Comprobadas las formulaciones determinadas en bibliografía como desarrollan la reproducción de levaduras se planteó medios de cultivo modificados a escala de litros para verificar la efectividad de los mismos.

Materiales, Reactivos y Productos

- ❖ Alfalfa
- ❖ Peptona
- ❖ Mangueras
- ❖ Melaza
- ❖ Motores de pecera
- ❖ Agua destilada
- ❖ Corchos de caucho
- ❖ Erlenmeyer
- ❖ Tubos de vidrio
- ❖ Masqui
- ❖ Algodón
- ❖ Vasos
- ❖ Papel de aluminio
- ❖ Pipetas
- ❖ Alcohol
- ❖ Papel toalla
- ❖ Marcado

Tabla 8-2: Formulación del medio de cultivo básico con y sin peptona

Con peptona	Pesos (g)	Sin peptona	Pesos (g)
Melaza	50	Melaza	50
Alfalfa	11.14	Alfalfa	11.14
Pepona	5.0		

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Procedimiento

Sin peptona:

- ✓ Se pesó 11.14 g de hojas de alfalfa, se lavó 3 veces con agua común, y se introduce en un recipiente con agua destilada hervida por 5 min para su desinfección.
- ✓ Esterilización en autoclave: Colocar en la autoclave 2 Erlenmeyer con 1000mL de agua destilada a una temperatura de 120 °C por 20 min.
- ✓ El Erlenmeyer esterilizado pasar a la cámara de flujo laminar por 15 min; junto con los materiales que se van a utilizar para la siembra como son los vasos de precipitación los tubos de ensayo, las pipetas, las mangueras, los corchos, y esterilizar con UV.
- ✓ Se preparó el jugo de alfalfa por licuado con 500 ml de agua destilada esterilizada; se cernió y se colocó en el Erlenmeyer.

- ✓ Se pesó 50 gr de melaza y se disolvió en 500 ml de agua destilada esterilizada; contenida en el Erlenmeyer que ya contiene el jugo de alfalfa.
- ✓ Se colocó en el Erlenmeyer con los caldos realizamos en el autoclave para esterilizarlos por 20 min; luego se las lleva a la cámara de flujos laminar por 15 min, y se prendió el UV.

Con peptona:

- ✓ Se utiliza la misma preparación anterior agregando la solución de peptona en las siguientes condiciones.
- ✓ Se pesó 5 g de peptona y se agregó a 1lt del medio sin peptona.
- ✓ Se colocó en el Erlenmeyer con los caldos realizamos en el autoclave para esterilizarlos por 20 min; luego se las lleva a la cámara de flujos laminar por 15 min, y se prendió el UV.

Preparación del inóculo

Se pesa 1 gr de levadura seca y se colocó en 9ml de agua destilada estéril para activar la misma, se lleva a la estufa se deja en 30°C por 15 min hasta se desprendan burbujas.

Inoculación del medio de cultivo

- ✓ Se inoculó 500 µl de medio de cultivo sin peptona en cada litro de medio de cultivo esterilizado.
- ✓ Diluciones del inóculo de 1g de levadura en 9ml de agua se hizo de la siguiente manera:
- ✓ Se midió 1ml del inóculo inicial I1 y se agregó al tubo de ensayo que contenía 9ml de agua destilada.
- ✓ Segunda dilución I2 se realiza tomando 1ml de la solución I1 colocándolo en 9ml de agua destilada.
- ✓ Las demás diluciones se realizan de la misma manera y el cálculo de la siguiente forma:
- ✓ $FD = 1\text{ml levadura} + 9\text{ml de agua} = 10\text{ml}$
- ✓ Se prepararon diluciones de $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$

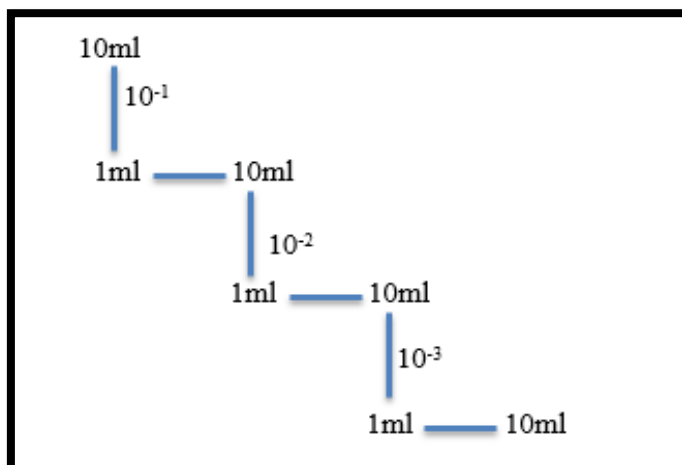


Figura 3-2: Cálculo del inóculo
Fuente: Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Determinación del número de levaduras del inóculo: Para verificar el número de levaduras del inóculo y su morfología se lo hace en la cámara de Neubauer o Hemocitometro.

- ✓ Se coloca una gota del medio de cultivo en el Hemocitometro, se lleva al microscopio para su observación a 40X.
- ✓ Se determina el cuadrante central de la cuadrícula y se realiza el conteo de las células del cuadrante superior, inferior, izquierdo y derecho excluyendo las levaduras que se encuentran en las líneas de las divisiones.
- ✓ Se cuentan el número de células en cada uno de los cuadrantes su suman, esta suma total se divide para 4 sacando un promedio por cada cuadrante.
- ✓ El valor constante en la cámara de New Baguer es de 25000.
- ✓ El caculo se lo realiza con la siguiente formula:

$$\text{Col/ml} = \text{N}^\circ \text{ células} \times 25000 \times \text{FD}$$

Col/ml = colonias sobre mililitro

N° células = promedio de las células en los cuatro cuadrantes

25000 = valor constante (área y volumen de la cámara)

FD = factor de dilución del inóculo

Verificación de contaminación

Los errores manuales como la mala esterilización dan lugar a la contaminación del inóculo, la siembra de un inóculo de este puede estar con la presencia de otros microorganismos como bacterias los que se verifican en el medio PDA.

Preparación de PDA

- ✓ Por la gran masa de colonias de levaduras que presenta el medio de cultivo sin peptona se va a realizar diluciones y sembrar en PDA para observar las colonias y la morfología.
- ✓ Para la solución de 200 ml de PDA se prepara con 8 g (PDA).

Inoculación en PDA

- ✓ Para realizar la siembra de diluciones se hace con micro pipetas descartables.
- ✓ La aspersión del inóculo en cada caja se lo hace con ASA microbiológica.
- ✓ Se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} se inocula 50 μ l, y en las diluciones de 10^4 , 10^5 , 10^6 se coloca 100 μ l de inóculo en cajas de PDA e incubados a 30 °C.
- ✓ Para sembrar se hace de menor a mayor concentración ósea 10^{-6} , 10^{-5} , y 10^{-4} , para evitar arrastrar poblaciones.

Conteo de colonias de levaduras

Las colonias de levaduras son las aglomeraciones o grupos que se encuentran en las cajas que fueron incubadas a 30°C .

Renovación de cultivo

La agregación del medio de cultivo se realiza en los Erlenmeyer con peptona y sin peptona que contenían melaza, jugo de alfalfa. Se hace cada 2.5 días, para cosechar las células en su mayor cantidad.

2.4.8. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de melaza

Determinados los macro y micro constituyentes del medio de cultivo para reproducción de levaduras de vino se debe determinar la concentración de melaza que mayor cantidad de masa de levaduras presente, como condición necesaria aireación constante.

Materiales, Reactivos y Productos

- | | |
|---------------------|---------------------|
| ❖ Alfalfa | ❖ Masqui |
| ❖ Mangueras | ❖ Algodón |
| ❖ Melaza | ❖ Vasos |
| ❖ Motores de pecera | ❖ Papel de aluminio |
| ❖ Agua destilada | ❖ Pipetas |
| ❖ Corchos de caucho | ❖ Alcohol |
| ❖ Erlenmeyer | ❖ Papel toalla |
| ❖ Tubos de vidrio | ❖ Marcador |

Producción de levadura a diferentes concentraciones de azúcar

Una vez comprobada que la fuente de azúcar es el factor limitante en la producción de levaduras se procedió a formular medios de cultivo con diferentes concentraciones de melaza y una de glucosa, la misma concentración de jugo de alfalfa solo se varió el volumen total a 500ml del medio de cultivo.

Determinación del contenido de azúcar en la melaza

La melaza comercial no tiene contenido de sacarosa por lo cual se determina preparando soluciones de pesos determinados de melaza con agua estéril a 10ml y determinando los grados °Brix, de esta manera se conocerá con cuanto de sacarosa se parte en el medio de cultivo.

Tabla 9-2: Determinación de grados °Brix en melaza

Concentración Melaza (g)	VOLUMEN TOTAL(mL)	Grados °Brix
1	10	7
2	10	15.7
3	10	23.5
4	10	30.5
5	10	36
Factor	10	10

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Tabla 10-2: Diferentes concentraciones de melaza y una de glucosa

Concentración melaza (g)	Jugo alfalfa 11.14g/500ml
200/500ml	500
300/500ml	500
400/500ml	500
800/500ml	500
Concentración glucosa	
300g/250ml	250

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Caracterización del jugo de alfalfa

La información bibliográfica indican que la alfalfa tiene micronutrientes, calcio, magnesio y hierro y como macronutrientes nitrógeno, fósforo y potasio los mismos que se determinaran en el jugo de alfalfa

Preparación del jugo de alfalfa

- ✓ Se pesó 11.14 gr de hojas de alfalfa fresca y se lava con agua estilada
- ✓ Las hojas limpias se licuo con 250 ml de agua destilada
- ✓ Se filtró el jugo a través de tamiz

Determinación de Ca y Mg

- ✓ Para hacer la determinación de Ca y Mg se tomó 10 ml de jugo de alfalfa y se diluyó a 100 ml con agua destilada
- ✓ En un Erlenmeyer se agregó 25 ml de esta dilución en los mismos se coloca 2 ml de buffer de pH 10, 1 ml de KCN al 1%, una pequeña cantidad de negro de Ericromo y por último se puso 1.15 ml de EDTA 0.02 M para ver la dureza
- ✓ Se determinó por titulación con EDTA

Determinación Ca

- ✓ Se colocó en un Erlenmeyer 25 ml de jugo diluido 1:10 se agregó 1 ml de cianuro de potasio KCN al 1%
- ✓ Se añadió 1 ml de hidróxido de sodio NaOH 1N, una pequeña cantidad de murexina de calcio y titula con EDTA

Determinación hierro Fe

- ✓ Se midió en un frasco 10 ml de jugo de alfalfa diluido en (1:10).
- ✓ En un segundo frasco se mide 10 mL de la solución inicial del jugo de alfalfa que constituya el blanco.
- ✓ Se leyó el Fotómetro hierro fenover, el blanco da un valor de 0,6 y la muestra
- ✓ La valoración del Hierro en la muestra diluida se realiza por cálculo de la dilución

Determinación de Fosfatos

- ✓ Se midió en un frasco 10 ml de jugo de alfalfa diluido en (1:10) y se agregó un sobre de reactivo Fenover agitar
- ✓ Se observó los cambios de coloración hasta que llegar una tonalidad azulada

- ✓ Colocar en la cubeta del fotómetro para medir, dio 0.51 mg por 100 ml
- ✓ Repetir el proceso con 10 mL de dilución y calcular en base a la referencia de 10mL

Determinación de nitrógeno total

- ✓ Encender el reactor OBB 200 y calentar a 105°C
- ✓ Mediante un embudo añadir el contenido de un sobre de reactivo de per sulfato de nitrógeno total en polvo; a los dos tubos de residuos de digestión de hidróxido de nitrógeno total RA limpiar bien el reactivo que haya podido quedar en la tapa o en la rosca del tubo.
- ✓ Añadir 0.5 ml de muestra a un tubo (esto es la muestra preparada. Añadir 0.5 ml de agua des ionizada incluido en el kit a otro tubo, este es el blanco del reactivo). Utilizar únicamente agua sin ningún tipo de sustancias que contengan N como alternativa para el agua des ionizada provista.
- ✓ Tapar ambos tubos. Agitar vigorosamente durante al menos 30 segundos para mezclar. El reactivo de per sulfato puede no disolverse completamente al agitar esto no afectara a la precisión.
- ✓ Colocar los tubos en el reactor. Calentar exactamente por 30 minutos.
- ✓ Empleando dediles, sacar inmediatamente los tubos calientes del reactor enfriar los tubos a temperatura ambiente.
- ✓ Seleccionar el test colocar el protector de luz en el compartimiento N° 2 de la cubeta.
- ✓ Destapar los tubos digeridos y añadir el contenido de un sobre A de reactivo de TN en polvo a cada tubo.
- ✓ Tapar los tubos y agitar durante 15 segundos
- ✓ Seleccionar en la pantalla el símbolo de temporizador y pulsar OK comienza un periodo de reacción de 30 minutos.
- ✓ Cuando suena el temporizador destapar los tubos y añadir un sobre B de reactivo TN un polvo a cada tubo
- ✓ Tapar los tubos y agitar durante 15 segundos el reactivo no se disuelve completamente esto no afectara a la precisión la solución adaptara un color amarillo
- ✓ Seleccionar en la pantalla el símbolo de temporizador y pulsar Ok, comienza el periodo de reacción de 2 minutos.
- ✓ Después que suene el temporizador destapara los tubos C de TN y añadir 2ml de muestra digerida y tratada a un tubo, añadir 2 ml de blanco de reactivo digerido y tratado a un tubo. Añadir 2ml de blanco de reactivo digerido y tratado al otro tubo C de reactivo TN
- ✓ Tapar los tubos e invertirlos 10 vasos para mezclar. Aplicar inversiones lentas cuidadosas para conseguir una completa recuperación.
- ✓ Al finalizar el periodo de 5 min de reacción el color amarillo se intensificara.

Preparación del Medio de cultivo con Jugo de Alfalfa y Melaza

- ✓ Los medios de cultivo a preparar son con alfalfa, melaza y agua destilada estéril.
- ✓ Se va a realizar cinco medios de cultivos con diferentes concentraciones de melaza 200-300-400 800g de melaza y con 300gr de glucosa.
- ✓ Se pesó 11.14 gr de alfalfa y licuo con 500ml de agua destilada estéril para la melaza; y con 250ml para la glucosa.
- ✓ En el caso de la melaza se llevó a 1000ml y en la glucosa a 500ml.
- ✓ Se esterilizó por 20 min a 120°C un Erlenmeyer con 1000ml de agua destilada, las pipetas, y todo los materiales a utilizarse; una vez culminada la esterilización húmeda se llevó a la cámara de flujo laminar se prende el UV y se deja por 15 min.
- ✓ Se preparó el jugo de alfalfa con 11.14 g en 500 ml de agua destilada esterilizada. Y determinó los °Brix del jugo de alfalfa
- ✓ Se disuelve las diferentes concentraciones de melaza (200,400,800) en 500 ml de agua destilada esterilizada y determina los grados °Brix
- ✓ Se mezcla en el Erlenmeyer el jugo de alfalfa y melaza diluida y determina los grados °Brix
- ✓ Se esterilizó por vía húmeda durante 20 minutos a 120°C y 1.2 at.
- ✓ El medio de cultivo estéril se pasó a cámara de flujo laminar con UV, determina los grados °Brix
- ✓ El medio esterilizado se trasladó a cámara de flujo laminar con temperatura ambiental, se sembró el inóculo.
- ✓ Los Erlenmeyer inoculados se pasan a cámara de desarrollo con aireación y controla la reproducción de la levaduras

- ✓ Medición grados °Brix a tiempos específicos y conteo de levaduras.

Para la glucosa el inóculo se preparó de la siembra de inóculo de levadura

- ✓ Se midió 3 ml de caldo de 400gr de melaza y lo colocó en el caldo de glucosa.
- ✓ Este proceso se repite para cada una de las concentraciones de melaza y glucosa, los resultados que se codifican en tablas.

2.4.9. Conteo de levaduras y medición

Procedimiento

Pusimos la muestra en el Hemocitometro y miramos el microscopio para contar; la cual fue imposible hacerlo. Para esto fue necesario hacer una dilución de 9.9 mL de agua destilada con 0.1 mL de caldo de cultivo.

Calculo de las UFC

- ✓ $\text{Con / ml} = \text{N}^\circ \text{ colonias contadas} \times 25000 \times \text{FD}$

Fórmula para el conteo de células

$$\text{Con / ml} = \text{N}^\circ \text{ coln} \times 25000 \times \text{FD}$$

$$\text{Con / ml} = 57 \times 25000 \times 10^5$$

$$\text{Con / ml} = 1.42 \times 10^9$$

El medio es propicio para la reproducción solo de levaduras, en el medio sin peptona se obtiene mayor cantidad y con morfología propia de este microorganismo

2.4.10. Identificación microscópica de la colonia CE 1118

Preparación de las placas

- ✓ Se puso una gota de agua destilada en la porta objetos.
- ✓ Con un palillo se coge la muestra de levadura de la caja Petri y se la dispersa en el porta objetos diluyéndolo.
- ✓ Colocó 1 gota de azul de metileno y se puso el cubre objetos
- ✓ Se llevó el porta objetos al microscopio para observar la morfología

2.4.11. Preparación de levadura seca

Reproducida la levadura en medio húmedo para su conservación es necesario lavarlas y secarlas, procediendo de la siguiente manera:

- ✓ Esterilización de materiales que serán utilizados en la filtración.
- ✓ Se dejó en reposo los medios de cultivo para que se facilite el proceso de filtración.
- ✓ La solución de lavado se hizo en relación 1:1 de caldo y agua destilada esterilizada.
- ✓ La filtración se realiza al vacío
- ✓ Los papeles filtro utilizados introducir en la solución de lavado
- ✓ Retirar el papel filtro
- ✓ Decantar la solución y se tienen las levaduras para secar
- ✓ Estos precipitados se colocaron en los tubos de centrifuga; con agua destilada estéril y solución salina respectivamente hasta que la solución salina sobrenadante sea clara.

Preparación de la solución salina

Preparar una solución salina para el lavado de los filtros.

Materiales, Reactivos y Productos

- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ Cloruro de Magnesio
- ✓ Fosfato ácido de potasio
- ✓ Sulfato de magnesio
- ✓ Pinzas
- ✓ Papel filtro
- ✓ Quitosato
- ✓ Embudo buchner
- ✓ Bomba al vacío
- ✓ Manguera

Procedimiento

- ✓ Todo el material se deja a esterilizar en la autoclave por 20 min.
- ✓ De ahí se saca del autoclave y se coloca en la cámara de flujo laminar se prende el UV por 15 min.
- ✓ Pesar 5 gr de cada solución salina y llevarlo a 1 litro por lo que se prepara 2 litros de solución por lo que se pesa el doble de cada sal.

2.4.12. Determinación de las características físicas y biológicas de las levaduras reproducidas

Las levaduras obtenidas en el medio de cultivo en melaza y jugo de alfalfa deben cumplir con algunos parámetros que le caractericen su forma y reproducción el mismo que se indican a continuación:

Preparación de medio PDA al 4 % y siembra

- ✓ Esteriliza por vía húmeda el licuado de medio PDA para la viabilidad de cálculos de las concentraciones C1, C2, C3, y C4 a partir de precipitado CE 1118.
- ✓ Se pesó a la cámara de flujo laminar y se distribuye en cajas Petri
- ✓ Se tomó un peso determinado de levaduras y se llevó a 10mL de solución salina
- ✓ Se sembró a 20 µl de solución de levaduras en las cajas Petri con el medio PDA, se espacio con un asa
- ✓ Se observó el desarrollo de las levaduras y conto cada 24 horas, este proceso se realizó para todas las concentraciones

Reactivación de levaduras: Colocar una cantidad determinada de levaduras en tubos de ensayo con agua estéril y dejar por 15 min en estufa a 35 °C. Se observar presencia o ausencia de burbujas.

Morfología

Después de las 24 horas de la siembra en la caja Petri se determinó la morfología de las levaduras en el microscopio para lo cual se procedió de la siguiente manera:

- ✓ De la caja Petri, con una llilete se separa una lámina del medio de cultivo
- ✓ La lámina se extiende en placa de vidrio con una gota de azul de algodón y se observa a través del microscopio con el lente de inmersión.
- ✓ Este procedimiento se lo hace para todas las concentraciones y los resultados se tabulan en una tabla

2.5. Procedimiento liofilización CE 1118

- ✓ Las Levaduras centrifugado con agua destilada estéril (lavados), y con solución salina manteniendo a 4°C durante 8 días.
- ✓ Las levaduras fueron sacadas con pinzas estériles de los tubos Eppendorf
- ✓ Se deja las levaduras centrifugadas en el congelador por 8 días
- ✓ Se llevaron los tubos con las levaduras a la cámara de flujo laminar para sacarlos de los mismos
- ✓ Los tubos con las levaduras se pesaran al igual que los tubos vacíos
- ✓ Las levaduras que fueron sacados con las pinzas esterilizadas se colocaran en el papel aluminio para pesar y hacer la diferencia de pasos.
- ✓ El papel aluminio con las levaduras se colocaran en las fundas que median
- ✓ Se llevaran las fundas al congelador REVCO que es de -20°C los mismos que se les dejo por 2 días.

CAPITULO III

3. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo tuvo como fundamento encontrar un medio de cultivo de bajo costo y alta producción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CE1118 que es importada y base fundamental para reproducir en el país llenando un nicho de mercado

3.1. Resultados y discusión

3.1.1. Medio de cultivo m-Green con y sin nitrato de amonio

Se consume el medio liquido transformándose en semi solido con poblaciones de hongos con forma micelar de color gris y baja población de bacterias. Por lo cual se descarta esta preparación.

Pero no presenta olor característico de levaduras (fermento).

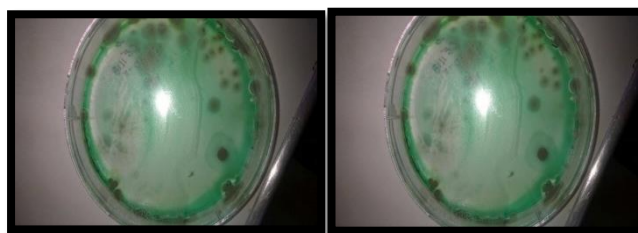


Figura 1-3: Medio de cultivo m-Green con y sin nitrato de amonio
Fuente: Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

3.1.2. Medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio



Figura 2-3: Medio de cultivo YPD + Antibiótico + Nitrato de Amonio
Fuente: Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

- ✓ La observación al microscopio de un frotis de una lámina del medio de cultivo con levaduras que presento su morfología irregular, sin olor característico y contaminación al almacenarse. Razón por la cual se desechó esta prueba.
- ✓ La inclusión de antibiótico en el medio es para evitar el desarrollo de bacterias, y el nitrato de amonio para aumentar la fuente inorgánica de nitrógeno pero no cumple su función. El pH

inicial de 4.13 que al esterilizar el medio de cultivo llego a 5.4, la información bibliográfica determina que el pH para el desarrollo de levaduras es de 5.45 hasta pH 7. Una forma de mantener el pH optimo es corrigiendo el pH acido con NaOH 1N.

- ✓ El desarrollo de las levaduras en un medio de cultivo está limitado por factores como el contenido de sacarosa, pH del medio de cultivo y el tiempo de producción para lo cual se determinó el contenido de sacarosa en la melaza medido por los grados °Brix, un dato referencial es que un gramo de melaza en una solución de 10ml contiene 7°Brix.

3.1.3. Medio de cultivo YPD + antibiótico

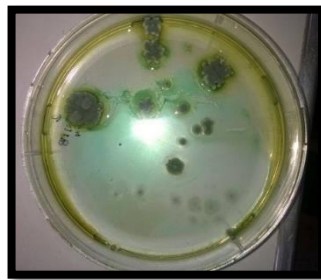


Figura 3-1: Medio de cultivo YPD + antibiótico
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

- ✓ El medio YPD es característico para levaduras según la información bibliográfica, el pH es de 4.54 y se corrige con NaOH 1N llevando a un pH de 5.39. La adición de antibiótico sirve para disminuir la presencia de bacterias, como resultado se tiene la presencia de levaduras morfología irregular, sin olor característico de fermento, y con bacterias.
- ✓ Se elimina este proceso por estar contaminados en el proceso de almacenamiento.

3.1.4. Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico

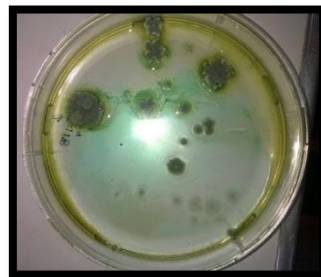


Figura 4-3: Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

- ✓ Este medio al contener el fosfato mono potásico se incrementa el macro elemento fosfato y el micro elemento potasio, se corrige el pH de 4.39 a 5.47 con NaOH 1N.
- ✓ Vistas al microscopio presentan levaduras con morfología irregular, sin olor a fermento y con bacterias, por lo cual se eliminan.

3.1.5. Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico + nitrato de amonio

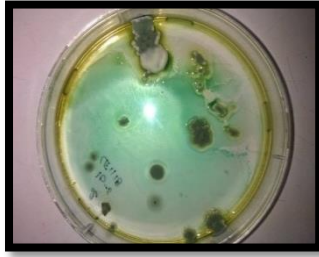


Figura 5-3: Medio de cultivo YPD + fosfato Mono potásico + nitrato de amonio
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

- ✓ Este medio al contener el fosfato mono potásico y nitrato de amonio se incrementa los macro elementos fosfato, nitrógeno y el micro elemento potasio, se corrige el pH de 4.44 a 5.37 con NaOH 1N.
- ✓ Vistas al microscopio presentan levaduras con morfología irregular, sin olor a fermento y con bacterias, por lo cual se eliminan.
- ✓ Hay crecimiento de colonias de levaduras y de hongos sin embargo el número y tamaño de las colonias no es abundante.
- ✓ Se llegó a la conclusión de que estos medios no son adecuados para la producción de las levaduras por tal motivo se hizo un cambio medio de cultivo y realizar la siembra en PDA común.

3.1.6. Medio de cultivo básico

- ✓ Los medios de cultivo anterior conteniendo sustancias inorgánicas como el nitrato y el fosfato parasen que no son fácilmente aprovechados por las levaduras y a su vez se desarrollan micelios y bacterias. Esta es la razón fundamental por la cual se busca en los micros elementos una fuente natural que aproveche el microorganismo para permanecer en forma de levadura.
- ✓ Entre los factores limitantes se consideran la sacarosa, las vitaminas consideradas como micro elementos y el pH, los cuales se encuentran en la melaza, la alfalfa y el pH en el rango de 5.45 a 7.
- ✓ El resultado de 7°Brix por cada gramo de melaza, la presencia de Ca, P, Fe, Mg y 29mg/L de N, son la base fundamental para el medio de cultivo que se utilizara para producir únicamente levaduras.

3.1.7. Medio de cultivo básico con y sin peptona

El medio de cultivo básico contiene 50g de melaza llevados a 500ml con agua estéril y jugo de 11.14g de hojas de alfalfa en 500ml de agua estéril. Se mezclan loas dos soluciones obteniendo un volumen total de 1lt.

Tabla 1-3: Formulación Medio de cultivo básico Con y Sin Peptona

Con peptona	Pesos (g)	Sin peptona	Pesos (g)
Melaza	50	Melaza	50
Alfalfa	11.14	Alfalfa	11.14
Peptona	5.0		

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

- ✓ En un 1lt de medio de cultivo básico con y sin peptona ya determinados se inocula 3ml del inóculo de levadura de 1g /10ml de solución con agua estéril.
- ✓ Se controla la reproducción de las levaduras con aireación y se determinó el número en un tiempo determinado de la siguiente manera.

3.1.8. *Conteo de las levaduras de los caldos con y sin peptona a las 24 h*

Tabla 2-3: Cuantificación del número de células de levadura con y Sin Peptona

Cuadrantes	Con Peptona	Sin Peptona
1	92	149
2	157	210
3	146	240
4	215	254
Total cuadrantes	610/4	854/4
Con / mil	152	213
UFC	1.9×10^3	2.6×10^3

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

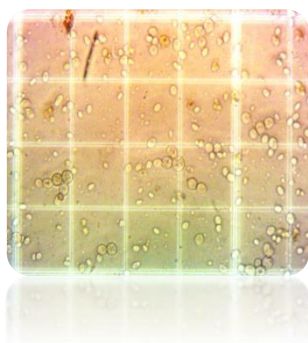


Figura 6-3: Sin peptona
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

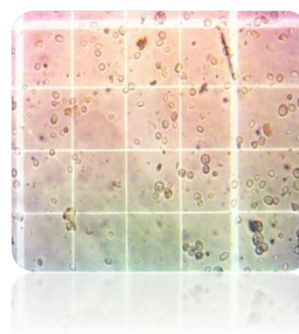


Figura 7-3: Con peptona
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Tabla 3-3: Cuantificación del número de células de levadura Con y Sin Peptona a diferentes horas.

Medio	Número de células	Tiempo (h)	UFC
Con peptona	239	45	$2.9 \cdot 10^3$
	402	105	$4.02 \cdot 10^3$
Sin peptona	257	45	$2.8 \cdot 10^3$
	338	105	$3.38 \cdot 10^3$
	320	573	$3.20 \cdot 10^3$

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Del resultado de UFC las levaduras sin peptona eran más pequeñas el tamaño celular es homogéneo y por lo tanto en el Hemocitometro habían en mayor cantidad mientras que las levaduras con peptona eran de mayor tamaño al igual que sus gemas por lo que al momento del conteo eran de menor número.

3.1.9. *Conteo de colonias de levaduras*

Evaluación antes de las 48 horas.

Tabla 4-3: Conteo de colonias de levaduras

CON PEPTONA	SIN PEPTONA
100 µl = presencia de masa de levadura	100 µl = presencia masa de levadura
100 µl = presencia de 50 colonias	50 µl = presencia 109 colonias
CONTROL = 0 COLONIAS DE LEVADURAS	

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

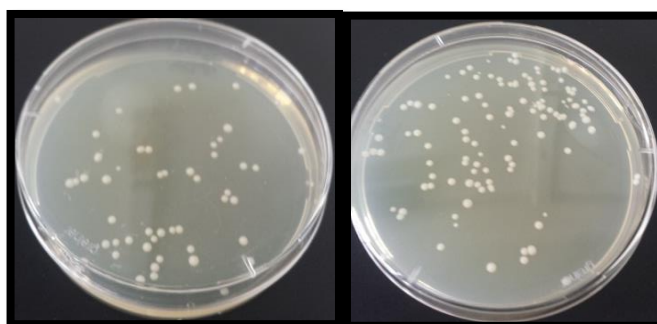


Figura 8-3: Conteo de colonias de levaduras

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

3.1.10. Registro de colonias levaduras

Crecimiento de levaduras CE1118 diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , inoculado 100 μ l para un control evaluado a las 68 horas.

Tabla 5-3: Registro de colonias de levaduras inoculado 100 μ l

Dilución	Numero de colonias
10^{-4}	> 300
10^{-5}	57
10^{-6}	8
CONTROL	0

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

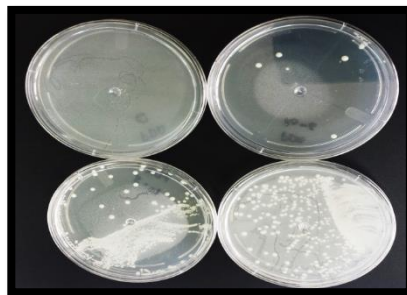


Figura 9-3: Registro de colonias de levaduras inoculado 100 μ l

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

De los resultados de conteo de levaduras en cajas Petri inoculando en concentraciones diferentes se determina que el inóculo para sembrar es de 100 μ l del inóculo de la dilución 10^{-4}

3.1.11. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de melaza

- ✓ Conociendo que el contenido de azúcar en el medio de cultivo es el factor limitante en la reproducción de levaduras se preparan a diferentes concentraciones para determinar la concentración ideal o de mayor producción de masa de levaduras. Una de las condiciones es la determinación de los grados $^{\circ}$ Brix antes y después de la esterilización del medio.
- ✓ La siembra del inóculo de la dilución 10^{-4} en un volumen de 100 μ l.

Tabla 6-3: Grados °Brix y pH en diferentes concentraciones de melaza

Concentración Melaza (gr)	Grados °Brix Antes de Esterilizar	Grados °Brix Después de Esterilizar	pH
200	12.4°	13.8°	5.8
300	18.0°	28.0°	5.76
400	27.0°	18.0°	6

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

3.1.12. Cuantificación de levaduras con las diferentes concentraciones de melaza y glucosa

Tabla 7-3: Cuantificación de levaduras con 200g de melaza

	°Brix	Población	Tiempo (h)
Melaza 200g	10	6.97	48
	9	6.77	133
	7.4	6.71	154
	8.2	7.17	181
	7.8	7.07	203
	8.2	6.69	271
	9	6.77	291
	9	6.85	315
	9	6.85	339

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Cuantificación de UFC en relación al tiempo.

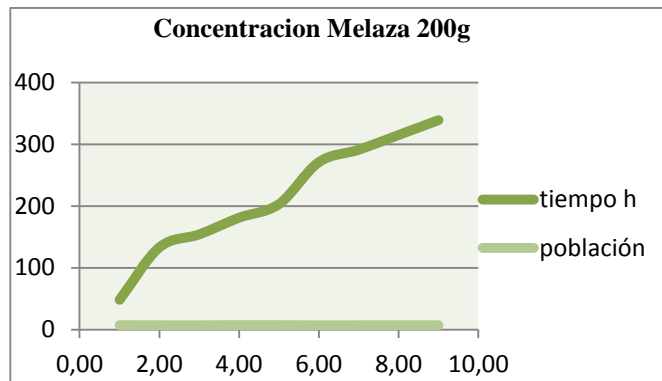


Figura 10-3: Relación Tiempo vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

El factor determinante para obtener una gran masa de levaduras es la fuente de azúcares (sacarosa), no así el factor tiempo que no incide en el crecimiento de las levaduras según se muestra en la tabla 7-3.

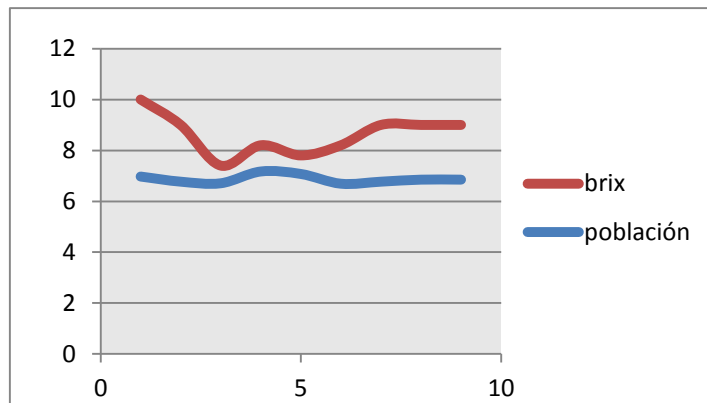


Figura 11-3: Relación °Brix vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Tabla 8-3: Cuantificación de levaduras con 300g de melaza

	°Brix	Población	Tiempo h
Melaza 300g	13,4	6.99	48
	11	6.98	133
	10,4	6.80	154
	11	7.43	181
	9,5	7.08	203
	11,8	6.96	271
	11	6.72	291
	11,5	6.83	315
	10,4	6.94	339

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Cuantificación de UFC en relación con el tiempo.

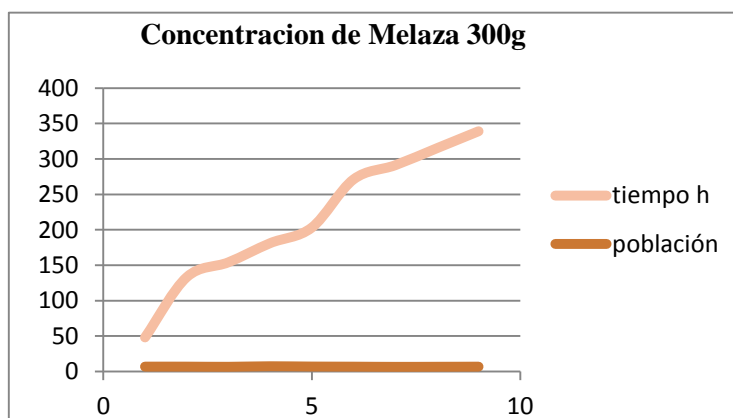


Figura 12-3: Relación Tiempo vs Población

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

El factor determinante para obtener una gran masa de levaduras es la fuente de azúcares (sacarosa), no así el factor tiempo que no incide en el crecimiento de las levaduras según se muestra en la tabla 8-3.

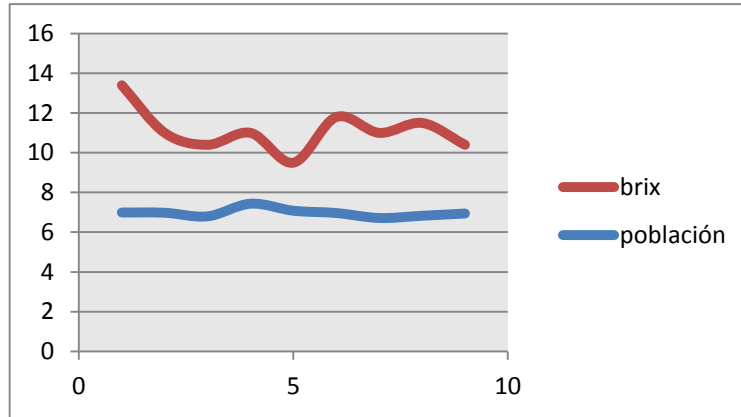


Figura 13-3: Relación °Brix vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Tabla 9-3: Cuantificación de levaduras con 400g de melaza

	°Brix	Población	Tiempo h
Melaza 400g	26.2	6.98	48
	18.5	7.00	133
	18	7.04	154
	18	7.63	181
	19.2	7.07	203
	21.4	6.99	271
	22	6.91	291
	22	6.95	315
	18	7.00	339

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Cuantificación de levaduras en relación al tiempo.

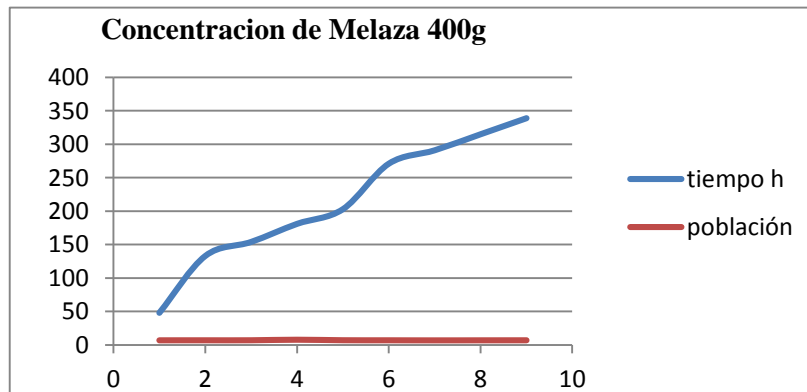


Figura 14-3: Relación Tiempo vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

El factor determinante para obtener una gran masa de levaduras es la fuente de azúcares (sacarosa), no así el factor tiempo que no incide en el crecimiento de las levaduras según se muestra en la tabla 9-3.

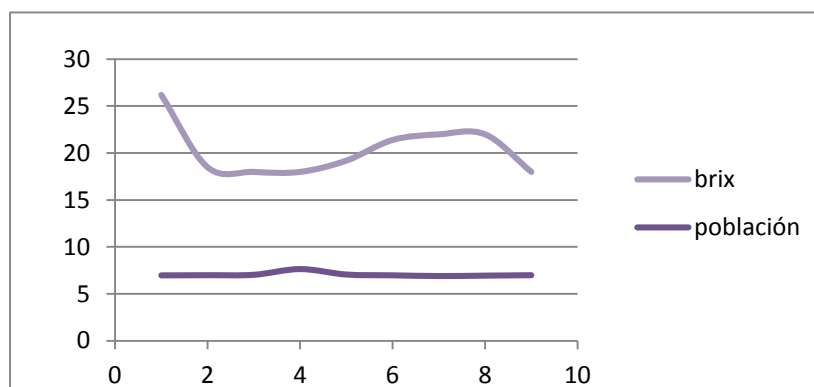


Figura 15-3: Relación °Brix vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 201

Tabla 10-3: Cuantificación de levaduras con 800g de melaza

	°Brix	Población	Tiempo h
Melaza 800g	35.5	7.04	22
	30	6.98	90
	27	6.85	114
	27	6.72	138
	23	6.79	162
	24	6.65	186
	24	6.88	256
	23	6.98	278
	23	7.18	298
	21.5	7.07	326
	26.5	7.93	350

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

El factor determinante para obtener una gran masa de levaduras es la fuente de azúcares (sacarosa), no así el factor tiempo que no incide en el crecimiento de las levaduras según se muestra en la tabla 10-3.

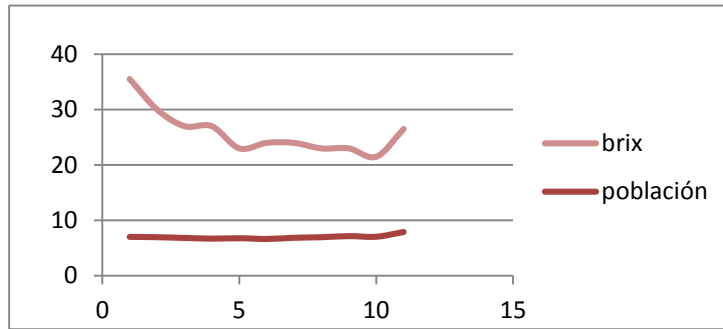


Figura 16-3: Relación °Brix vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Cuantificación de levaduras en relación al tiempo

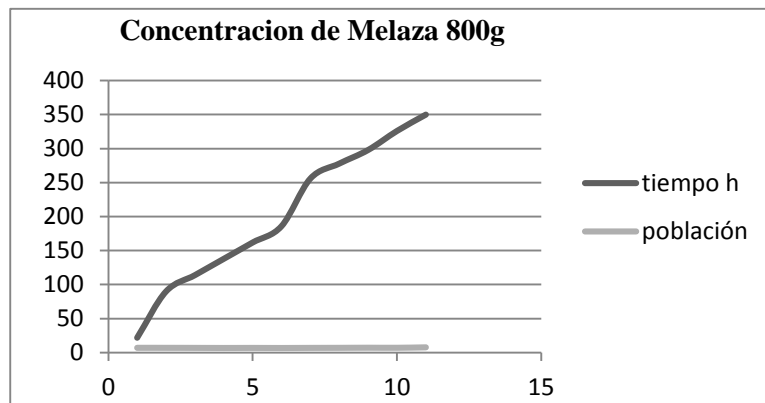


Figura 17-3: Relación Tiempo vs Población
Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

Con 800g de melaza la población de levadura se incrementa en proceso continuo sin formar mesetas de estabilidad y descenso constituyéndose así la cantidad adecuada para la producción de levaduras, los grados °Brix ideales son de 26° y a 350 horas con una población d 7.93 UFC/ml (log10).

Este es el método que se escogió para la producción de levaduras, después de la cosecha se lavó, secaron y se enfundaron en cantidades similares.

3.1.13. Rendimiento de las levaduras

Tabla11-3: Rendimiento de levaduras

Levadura (g)	Solución (ml)
1	10
0.30	3
0.3	3
68.69	4000
0.0515175	3
Rendimiento	
0.3	100
0.0515175	17.17%

Fuente: LCB.FRN- ESPOCH

Realizado por: Colcha Lorena y Morillo Silvia, 2016

El rendimiento de reproducción de levaduras se calculó en base a los gramos contenidos en el medio de cultivo, obteniéndose 70.54g de levadura en 4lt de medio de cultivo y el porcentaje de reproducción es de 17.17% el mismo que se considera alto ya que se obtuvo en un tiempo de 12 días.

Esta puede ser una razón por la que las levaduras se mezclan con aglutinantes como la sacarosa para formar micro capsulas.

CONCLUSIONES

- ✓ De los ocho medios de cultivo probados para el crecimiento de levaduras, el medio formulado a base de melaza y jugo de alfalfa resultó el más adecuado para la obtención de 7.63 UFC, debido a la disponibilidad de azúcares, macro y micronutrientes que permiten un crecimiento óptimo de *Saccharomyces cerevisiae*.
- ✓ El medio de cultivo m -Green y YPD con antibióticos y fuentes químicas nitrogenadas y fosforadas muestran influencia negativa en la morfología de colonia de *Saccharomyces cerevisiae* aduciendo que tanto el ácido fosfórico como el sulfato de amonio afectan algún proceso fisiológico de esta levadura, además se observó el crecimiento y desarrollo de hifas de hongos saprófitos.
- ✓ Transcurrido las 181 horas de incubación a temperatura ambiente (25°C +/- 1°C), se registró el inicio de la fase de latencia, debido a que no hay pérdida de las UFC de levaduras, sin embargo se registra una reducción metabólica de las células debido a que no hay alteración en el registro de consumo de la principal fuente de azúcares (melaza) según el dato de grados °Brix.
- ✓ Las UFC obtenidas a las 181 horas, crecidas en PDA muestran una viabilidad del 100%, además la morfología macroscópica y microscópica es característica de la descrita para *Saccharomyces cerevisiae*.
- ✓ El rendimiento alcanzado en la obtención de masa liofilizada de *Saccharomyces* a escala de laboratorio que fue de 17.17% muestra que la utilización de fuentes naturales de nutrientes como nitrógeno y fósforo pueden influir en el crecimiento y reproducción de las levaduras, para obtener grandes masas que pudieran tener aplicación industrial.

RECOMENDACIONES

- ✓ Obtener la masa de *Saccharomyces* con la misma formulación del medio de cultivo, pero manejando otros factores que pudieran influenciar en el crecimiento y reproducción como la temperatura, incidencia de luz, y otras fuentes de nutrientes con mayores contenidos de fosforo y nitrógeno.
- ✓ La sustitución de la melaza como fuente de azúcar por otras que no incidan en la coloración de la masa microbiana obtenida como la miel de caña.
- ✓ Buscar nuevas alternativas para la producción vinícola en base a fuentes de nutrientes netamente biológicas, descartando a las sintéticas para evitar riesgos de contaminación.
- ✓ La biomasa de *Saccharomyces* puede ser recuperada después del proceso de fermentación vinícola para su reutilización.

BIBLIOGRAFÍA

1. **D. Krikorian** *Medios de cultivo: generales, comparación y preparación* New York. EE.UU, 1998 pp.349-354
2. **Alicia González y Lourdes Valenzuela** *Saccharomyces cerevisiae* [en línea] México D.F. C.P. 04510. [Consulta: 23 julio 2016] Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16>
3. **Erika. E. Fajardo Castillo y Sandra. C. Sarmiento Forero** *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces* [En línea] (tesis pregrado). (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Bogotá, D.C, 2007 pp. 4-20. [Consulta: 12 julio 2016]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>
4. **Gidolquim** *El proceso de la liofilización - Técnicas y operaciones* [en línea] Chile. [Consulta: 26 julio 2016]. Disponible en: <http://www.ub.edu/talq/es/node/261> ,2014
5. **González Lázaro Miriam**, *Caracterización bioquímica y biotecnológica de la levadura. Saccharomyces cerevisiae” GL 15 bioquímica y la levadura. GL 15*[en línea] España. [Consulta: 12 julio 2016]. Disponible en: http://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000802.pdf, 2014
6. **James E. F. Reynolds. London, Rodríguez, Jesus. Martindale.** *The Extra Pharmacopeia.* Thiertieth Edition. México. 01/02/1993 pp.569-575
7. **Karina Medina, et al.** “aplicación de la levadura hanseniaspora vineae en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación” *Revista Enología*, 2007, (Argentina) vol.2, n° 6 (2008) pp.1-6
8. **Michael T. Madigan.et al.** *Biología de los microorganismos.* Pearson 12 da edición 1999 pp.172-175 ; 811-841

9. **Patricia Arias López**, *Análisis genómico de la integridad celular en Saccharomyces cerevisiae* [En línea] (tesis doctorado). Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, Madrid, 2012 pp. 67-75. [Consulta: 14 julio 2016]. Disponible en: <http://eprints.sim.ucm.es/15170/1/T33738.pdf>

10. **V. M. Vagabov, L. V. Trilisenko, and I. S. Kulaev** *Dependence of Inorganic Polyphosphate Chain Length on the Orthophosphate Content in the Culture Medium of the Yeast Saccharomyces cerevisiae* Moscow. Vol. 65, No. 3, 2000 pp.349-35.

ANEXOS

Anexo A: Procedimiento de la elaboración del medio de cultivo para la *Saccharomyces cerevisiae* (CE1118).



Esterilización de Materiales



Preparación Medios de Cultivo



Medios de Cultivo



Instalación Equipo



Desinstalación de Equipo



Erlenmeyer con levadura



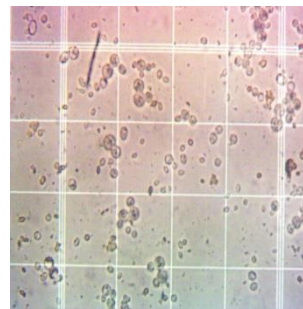
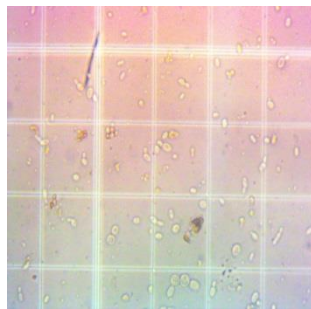
Muestra para cuantificación



Cuantificación Hemocitometro

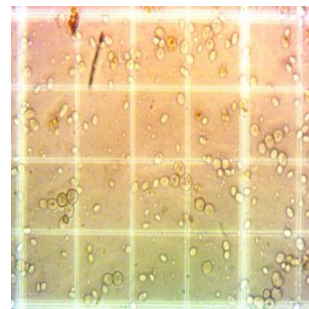
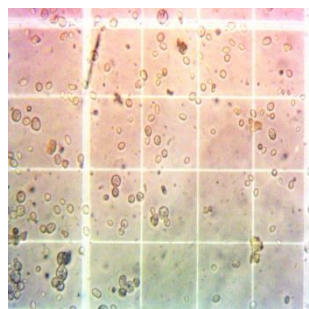
Anexo B: Conteo de levaduras a las 45 horas

Cuadrantes	Con Peptona	Sin Peptona
1	246	250
2	260	273
3	217	243
4	235	263
Total cuadrantes	958 / 4	1029 / 4
Con / mil	239	257
TOTAL UFC	$2.9 \cdot 10^3$	$2.8 \cdot 10^3$



Anexo C: Conteo de levaduras a las 105 horas

Cuadrantes	Con Peptona	Sin Peptona
1	318	316
2	428	390
3	387	427
4	478	419
Total cuadrantes	1611 / 4	1552 / 4
Con / mil	402	338
TOTAL UFC	$5 \cdot 10^3$	$4.2 \cdot 10^3$



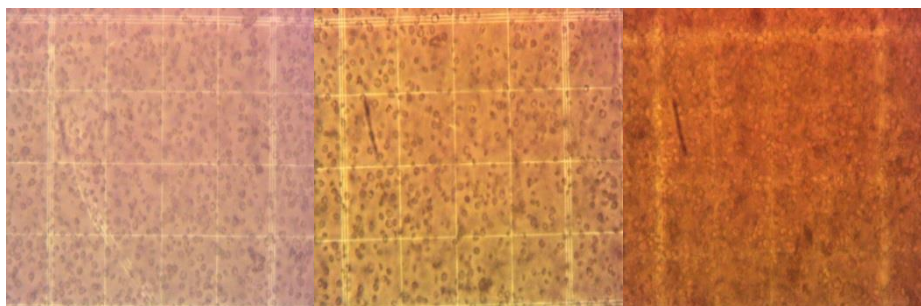
Anexo D: Pruebas °Brix medio de cultivo 108 hora

Dilución

G	ml H2O		
1	9	7	
2	8	15.7	GRADOS
3	7	23.5	BRIX
4	6	30.5	
5	5	36	

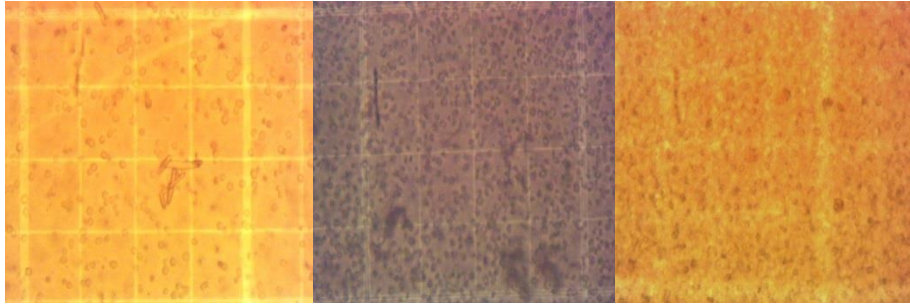
Anexo E: Conteo de levaduras y medición de los grados °Brix a las 133 horas

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	9.0°	$25+26+22+26=99/4 = 24 =$	6×10^6
300	11.0°	$36 + 30 + 49 + 38 = 153/4 = 38 =$	9.5×10^6
400	18.5°	$36 + 36 + 36 + 57 = 165/4 = 41 =$	1.02×10^7



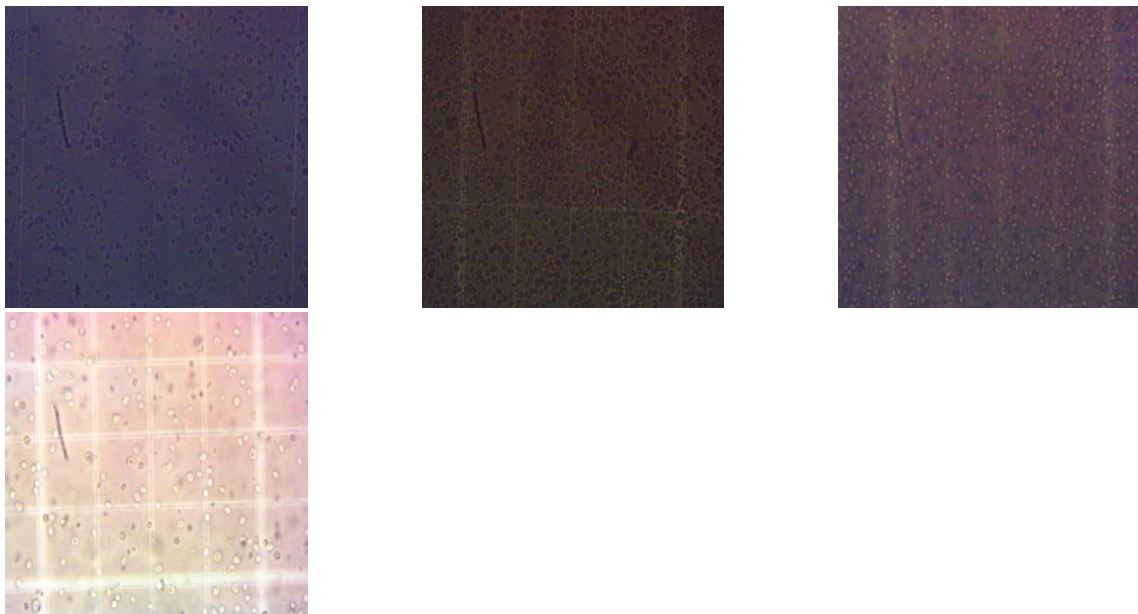
Anexo F: Conteo de levaduras y medición de grados °Brix a las 154 horas

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	7.4°	$24 + 22 + 15 + 23 = 84/4 = 21 =$	5.2×10^6
300	10.4°	$23 + 25 + 23 + 31 = 102/4 = 25 =$	6.3×10^6
400	18.0°	$45 + 48 + 44 + 45 = 182/4 = 45 =$	1.13×10^7



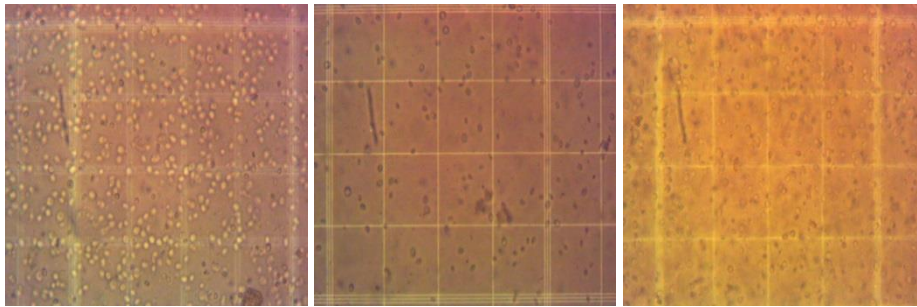
Anexo G : Conteo de células y medición de grados °Brix a las 181 horas

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	8.2	$57 + 63 + 66 + 61 = 247/4 = 61 = 1.5 \times 10^7$	
300	11.0	$98 + 106 + 117 + 122 = 443/4 = 110 = 2.7 \times 10^7$	
400	18.0	$157 + 212 + 180 + 140 = 689/4 = 172 = 4.3 \times 10^7$	
Glucosa	19.0	$115 + 120 + 100 + 90 = 415 / 4 = 103 = 1.2 \times 10^6$	



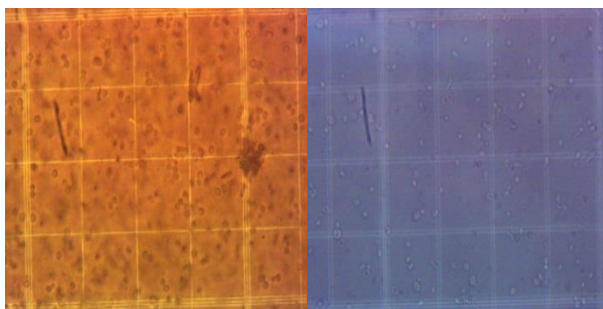
Anexo H: Conteo y medición de los grados °Brix 203 horas

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	7.8	$46 + 51 + 55 + 54 = 201/4 = 50 = 1.2 \times 10^7$	
300	9.5	$50 + 57 + 45 + 51 = 203/4 = 50 = 1.2 \times 10^7$	
400	19.2	$55 + 45 + 43 + 48 = 189/4 = 47 = 1.1 \times 10^7$	
Glucosa	22.5	$35 + 37 + 33 + 38 = 143 / 4 = 35 = 4.3 \times 10^5$	
800	35.5	$38 + 44 + 50 + 48 = 180 / 4 = 45 = 1.1 \times 10^7$	



Anexo I: Medición de grados °Brix y conteo de levadura 271 horas

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	8.2	$19 + 20 + 23 + 19 = 81/4 = 20 =$	5×10^6
300	11.8	$30 + 38 + 29 + 52 = 149/4 = 37 =$	9.2×10^6
400	21.5	$34 + 36 + 33 + 55 = 158/4 = 39 =$	9.7×10^6
Glucosa	26.0	$15 + 10 + 21 + 13 = 59 / 4 = 14 =$	1.7×10^5
800	30.0	$33 + 34 + 38 + 47 = 152 / 4 = 38 =$	9.5×10^6



Anexo J: Medición de grados °Brix y conteo de levaduras 291 horas

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	9.0	$21 + 27 + 30 + 18 = 96/4 = 24 =$	6×10^6
300	11.0	$19 + 33 + 15 + 20 = 87/4 = 21 =$	5.2×10^6
400	22.0	$33 + 34 + 32 + 35 = 134/4 = 33 =$	8.2×10^6
800	27.0	$15 + 27 + 35 + 35 = 112 / 4 = 28 =$	7×10^6
Glucosa	27.0	$15 + 14 + 20 + 16 = 65 / 4 = 16 =$	2×10^5

Anexo K: Medición de grados °Brix y conteo de levaduras

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	9.0	$31 + 28 + 28 + 29 = 116/4 = 29 =$	7.2×10^6
300	11.5	$24 + 29 + 27 + 30 = 110/4 = 27 =$	6.7×10^6
400	22.0	$34 + 31 + 37 + 42 = 144/4 = 36 =$	9×10^6
800	27.0	$20 + 22 + 19 + 25 = 86/4 = 21 =$	5.2×10^6
Glucosa	30.0	$29 + 28 + 29 + 25 = 111/4 = 27 =$	3.3×10^5

Anexo L: Medición de grados °Brix y conteo de levaduras

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
200	9.0	$30 + 30 + 28 + 29 = 117/4 = 29 = 7.25 \times 10^6$	
300	11.0	$35 + 31 + 38 + 37 = 141/4 = 35 = 8.75 \times 10^6$	
400	21.0	$36 + 37 + 42 + 48 = 163/4 = 40 = 1.0 \times 10^7$	
800 (162 h)	23.0	$21 + 26 + 26 + 30 = 103/4 = 25 = 6.25 \times 10^6$	
Glucosa (168 h)	29.0	$15 + 16 + 15 + 19 = 64/4 = 16 = 4 \times 10^6$	

Anexo M: Medición de grados °Brix de la glucosa y $c_4 = 800\text{gr}$

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
800 (186 h)	24.0	$15 + 13 + 15 + 25 = 73/4 = 18 =$	4.5×10^6
Glucosa (192 h)	32.4	$32 + 30 + 31 + 28 = 121/4 = 30 =$	3.7×10^5

Anexo N: Conteo de levaduras y medición de grados °Brix

Concentración	Grados °Brix	Número de células	UFC
800 (255 h)	24.0	$21 + 31 + 35 + 35 = 122/4 = 30 =$	7.5×10^6
Glucosa (264 h)	41.0	$26 + 32 + 39 + 30 = 127/4 = 31 =$	3.8×10^5

Anexo O: Volumen final que se obtuvo de medio de cultivo con las diluciones de agua destilada estéril y solución salina 5%.

Concentración (g)	Medio de cultivo existente original (ml)	Agua destilada esterilizada (ml)	Medio de cultivo final (ml)
200	65		65
300	800	595	1395
400	500	471	971

Concentración (g)	Medio de cultivo existente original (ml)	Solución salina (ml)	Medio de cultivo final (ml)
200	65		65
300	800	478	1278
400	500	482	982

Anexo P: Medición de °Brix y conteo de levaduras de concentración de melaza 800gr 278 horas

Concentración	°Brix	Número de células	UFC
800gr	23	$35 + 38 + 39 + 40 = 152/4 = 38 =$	$9,5 \times 10^6$

Anexo Q: Medición de grados °Brix y conteo de células concentración 800gr melaza 298 horas

Concentración	°Brix	Número de células	UFC
800gr	23°	$37 + 40 + 45 + 48 = 170/4 = 42 =$	$1,05 \times 10^7$

Anexo R: Medición de grados °Brix y conteo de células concentración 800gr melaza 326 horas

Concentración	°Brix	Número de células	UFC
800gr	21,5°	$46 + 48 + 46 + 49 = 189/4 = 47 =$	$1,17 \times 10^7$

Anexo S: Medición de grados °Brix y conteo de células concentración 800gr melaza horas

Concentración	°Brix	Número de células	UFC
800gr	26.5°	$31+33+36+39= 139/4 =$	$8.5 * 10^6$