



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL SIMÓN RODRÍGUEZ
NÚCLEO REGIONAL DE EDUCACIÓN AVANZADA DE VALENCIA

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A
PARTIR DE PASTA ALIMENTICIA NO COMERCIAL
DE DESCARTE UTILIZANDO LEVADURA**

Saccharomyces cerevisiae

**Trabajo presentado como requisito parcial para Optar al Grado de Magíster en
Biotecnología Alimentaria**

Autora: Lcda. Victmar E. Agüero A.

Tutor: MSc. Efraín A. García

Independencia, junio del 2019



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL SIMÓN RODRÍGUEZ
DECANATO DE EDUCACIÓN AVANZADA
NÚCLEO REGIONAL DE EDUCACIÓN AVANZADA DE VALENCIA
YARACUY – INDEPENDENCIA

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A
PARTIR DE PASTA ALIMENTICIA NO COMERCIAL
DE DESCARTE UTILIZANDO LEVADURA**
Saccharomyces cerevisiae

Tutor: MSc. Efraín A. García

C.I: 7.578.198

Autora: Lcda. Victmar E. Agüero A.

C.I: 15.388.846

Independencia, 2019



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL SIMÓN RODRÍGUEZ
DECANATO DE EDUCACIÓN AVANZADA
NÚCLEO REGIONAL DE EDUCACIÓN AVANZADA DE VALENCIA
YARACUY – INDEPENDENCIA

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE PASTA ALIMENTICIA NO COMERCIAL DE DESCARTE UTILIZANDO LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Tutor: MSc. Efraín A. García

Autora: Lcda. Victmar E. Agüero A.

Fecha: Junio, 2019

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo producir proteína unicelular a partir de pasta alimenticia no comercial utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Con la finalidad de dar respuesta a un problema planteado en cuanto a la dificultad de adquirir materia prima con elevado valor proteico en el mercado por parte de una empresa de alimentos balanceados para animales, dándole así por medio de una propuesta biotecnológica, la opción de expandir sus líneas de producción y solventar su necesidad. El trabajo experimental se inició con la caracterización de la pasta obteniendo un valor de 72,58 % de almidón. Luego, se sometió al sustrato a tratamiento enzimático en donde se obtuvo 1,37 mg/l de azúcares reductores mientras que, en la hidrólisis ácida se obtuvo un valor de 2,17 mg/l. Posteriormente, se aplicaron tres tratamientos que consistieron en utilizar en uno melaza como sustrato, en otro la pasta hidrolizada enzimáticamente y un tercero donde se aplicó hidrólisis ácida para la producción de biomasa. Luego, mediante el método de Lowry se determinó la concentración de proteína en cada tratamiento; El tercer tratamiento, relacionado a la hidrólisis ácida resultó con el valor más alto de proteína con 25,61 %. Finalmente, el análisis de varianza aplicado con un nivel de confianza de 95 % mostro que el tratamiento hidrólisis enzimática en función de la densidad óptica fue el mejor, con una media de 2,79. Conclusiones: El contenido de almidón presente en la pasta es idóneo para obtener azúcares metabolizables. Las condiciones a las que se trabajó las enzimas permitieron un incremento proteico en el uso de la pasta como sustrato. El mejor tratamiento fue el enzimático y puede tomarse como propuesta para la producción de biomasa.

Palabras claves: Proteína unicelular, *Saccharomyces cerevisiae*, almidón, hidrólisis enzimática, pasta.

I. INDICE GENERAL

I	INDICE GENERAL.....	iv
II	INDICE DE TABLAS.....	vii
III	ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
IV	INTRODUCCIÓN.....	1
V	EL PROBLEMA.....	3
5.1	Planteamiento del problema.....	3
5.2	Formulación del problema.....	4
VI	OBJETIVOS.....	5
6.1	Objetivo general.....	5
6.2	Objetivos Específicos.....	5
VII	JUSTIFICACIÓN.....	6
VIII	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
8.1	Antecedentes.....	8
8.2	MARCO TEÓRICO.....	18
8.2.1	La pasta Alimenticia.....	18
8.2.2	Pasta alimenticia de sémola Durum y harina de trigo.....	18
8.2.3	Pasta alimenticia de sémola y harina de trigo.....	19
8.2.4	Clasificación.....	19
8.2.5	Descripción de la pasta alimenticia no comercial de descarte.....	19
8.2.6	Almidón Generalidades.....	20
8.2.7	Amilosa.....	21
8.2.8	Amilopectina.....	21
8.2.9	Enzimas.....	21
8.2.10	Hidrólisis Enzimática.....	21
8.2.11	Alfa amilasa.....	22
8.2.12	Pululanasa.....	23
8.2.13	Hidrólisis Química. Método químico.....	24
8.2.14	Proteína Unicelular.....	24
8.2.15	Composición general de la biomas microbiana.....	25
8.2.16	Levadura.....	26
8.2.17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Generalidades.....	26
8.2.18	Requerimientos Nutricionales.....	27
8.2.18	Factores y condiciones de crecimiento.....	27
8.2.19	Composición química.....	27
8.2.20	Factores y condiciones de crecimiento.....	28
8.2.21	Morfología.....	28
8.2.22	Metabolismo Celular.....	29
8.2.23	Metabolismo de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
8.2.24	Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa.....	32
8.2.25	Proceso de producción.....	32
IX	METODOLOGÍA.....	34
9.1	Diseño de la Investigación.....	34
9.2	MATERIALES Y METODOS.....	34
9.2.1	Población y Muestra.....	34
9.3	Plan experimental.....	35

9.3.1	Caracterización de la Materia prima pasta alimenticia de sémola de trigo durum y agua.....	35
9.4	Determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis de la enzima alfa amilasa y pululanasa en la hidrólisis del almidón.....	34
9.4.1	Caracterización de las Enzimas.....	34
9.5	Tratamiento enzimático de la pasta alimenticia empleando enzima amilasa y la enzima y pululanasa de Sigma.....	36
9.5.1	Reacción con alfa amilasa.....	36
9.5.2	Reacción con pululanasa.....	37
9.5.3	Desarrollo de la hidrólisis enzimática.....	37
9.5.4	Descripción del esquema tecnológico del tratamiento enzimático de la pasta alimenticia empleando enzima alfa amilasa y la enzima y pululanasa de Sigma.....	37
9.5.5	Determinación de azúcares totales por el método de DNS. Técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico.....	41
9.6	Hidrólisis química tratamiento aplicado a la pasta alimenticia.....	42
9.6.1	Esquema tecnológico de la hidrólisis ácida tratamiento aplicado a la pasta alimenticia.....	42
9.7	Microorganismo.....	45
9.8	Preparación del inóculo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
9.9	Evaluación de los tres tratamientos: 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática e 3. Hidrólisis ácida como sustrato en la producción de biomasa por la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
9.9.1	Diseño del medio de cultivo experimental.....	45
9.9.2	Condiciones de cultivo aeróbico.....	46
9.9.3	Producción de biomasa.....	46
9.9.4	Esquema tecnológico de la evaluación de los tres tratamientos: 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática e 3. Hidrólisis ácida como sustrato en la producción de biomasa por la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
9.9.5	Valoración de proteínas por el método de Lowry. Fundamento Teórico.....	51
9.9.5.1	Determinación de proteína por método Lowry.....	52
9.9.6	Determinación de 3,5- dinitrosalicílico al sobrenadante obtenido del proceso de producción de biomasa.....	52
9.9.7	Equipo de fermentación.....	52
9.9.8	Determinación del tiempo del proceso de producción de biomasa.....	53
9.9.9	Preparación de tres tratamientos 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática 3. Hidrolisis ácida (p/v) como sustrato para el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
9.9.10	Medición de crecimiento microbiano en cámara de Neubauer para el recuento de levaduras.....	53
9.9.11	Determinación de biomasa.....	54
9.9.12	Análisis de la Varianza (ANOVA) a los tres tratamientos en la producción de biomasa.....	55
9.9.12.1	Análisis Estadístico Análisis de la Varianza (ANOVA).....	51
X	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	56
10.1	Caracterización de la pasta alimenticia no comercial para identificar su composición nutricional.....	56
10.2	Condiciones óptimas de hidrólisis de enzima alfa amilasa y pululanasa en la hidrólisis de almidón.....	57

10.2.1	Determinación de la curva patrón de glucosa.....	57
10.3	Cinética de la alfa amilasa.....	57
10.4	Cinética de la pululanasa.....	58
10.5	Tratamiento enzimático de las enzimas sobre la pasta alimenticia como sustrato empleando enzima α -amilasa y la enzima pululanasa.....	60
10.6	Hidrólisis química de la pasta alimenticia empleando ácido clorhídrico 6 N.....	61
10.7	Evaluación de los tres tratamientos: 1. Hidrólisis enzimática, 2. Hidrólisis ácida y 3. Melaza como sustrato en la producción de biomasa por la <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	62
10.7.1	Comportamiento del pH.....	62
10.8	Determinación de proteína por método lowry.....	65
10.8.1	Determinación de la curva patrón de albumina.....	65
10.9	Crecimiento microbiano.....	67
10.10	Análisis de Varianza.....	68
XI	CONCLUSIONES.....	70
XII	RECOMENDACIONES.....	71
XIII	BIBLIOGRAFÍA.....	72

II. INDICE DE TABLAS

N.		Pág.
1	Caracterización de las enzimas alfa amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de la yuca.....	9
2	Características de la biomasa obtenida por tratamiento enzimático con el consorcio formado por <i>Sch. Casteli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	11
3	Composición físico-química y propiedades enzimáticas de la pasta húmeda y del aditivo microbiano.....	13
4	Caracterización de las levaduras <i>C. utilis</i> y <i>S. cerevisiae</i> en base seca.....	15
5	Tiempo para alcanzar la fase estacionaria en la curva de crecimiento en suero de queso, para <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Candida kefyr</i> . Costa Rica, abril 2004- marzo 2005.....	16
6	Composición nutricional de la pasta alimenticia.....	19
7	Composición química de las levaduras.....	28
8	Composición Fisicoquímica de la pasta no comercial.....	56
9	Comportamiento de la enzima alfa amilasa en función del tiempo, concentración, temperatura y pH usando almidón puro como sustrato.....	57
10	Comportamiento de la enzima pululanasa en función del tiempo, concentración, temperatura y pH usando almidón puro como sustrato.....	58
11	Resultados obtenidos de la determinación de proteína por Lowry aplicado a los tres tratamientos desarrollados.....	65
12	Concentración celular tomada al inicio y final del proceso de producción de biomasa obtenido de los tres tratamientos aplicados.....	67
13	Análisis de la varianza de la medición de la densidad óptica para los tres tratamientos usados para el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
14	Evaluación de los tres tratamientos Test: Tukey.....	68

III. ÍNDICE DE FIGURAS

N.		Pág.
1	Hidrólisis del almidón, variación en la concentración de azúcares reductores durante el proceso de fermentación microbiana.....	12
2	Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con extracto ácido de café, Urea, K ₂ HPO ₄ , extracto de malta líquido, melaza.....	14
3	Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
4	Esquema tecnológico del tratamiento enzimático de la pasta alimenticia empleando enzima α -amilasa y la enzima y pululanasa de Sigma.....	40
5	Esquema tecnológico de la hidrólisis ácida tratamiento aplicado a la pasta alimenticia.....	44
6	Esquema tecnológico de la producción de biomasa usando melaza como sustrato por la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
7	Esquema tecnológico de la producción de biomasa usando la pasta hidrolizada enzimáticamente como sustrato por la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
8	Esquema tecnológico de la producción de biomasa usando la pasta hidrolizada químicamente como sustrato por la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
9	Medición de la actividad enzimática de la α amilasa en función del tiempo.....	55
10	Medición de la actividad enzimática de la pululanasa en función del tiempo....	59
11	Comportamiento del pH durante la producción de biomasa usando como sustrato la melaza.....	62
12	Comportamiento del pH durante la producción de biomasa usando como sustrato la pasta tratada enzimáticamente.....	63
13	Comportamiento del pH durante la producción de biomasa usando como sustrato la pasta tratada químicamente.....	64
14	Análisis de varianza de la medición de la densidad óptica en el tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3 de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69

IV. INTRODUCCIÓN

Desde hace años el ser humano se ha preocupado por la alimentación y se ha dedicado a desarrollar diversos procesos biotecnológicos para garantizar la misma, por otra parte, también ha demostrado gran interés en proporcionar una buena alimentación a animales de cría y animales domésticos y razón que lo lleva al desarrollado de investigaciones biotecnológicas que permiten garantizar una alimentación adecuada para los mismos.

En este sentido, una de las fuentes nutricionales más importante para incorporar en la dieta de los animales son las proteínas, ya que estas son el principal componente de los músculos, los órganos y las glándulas. Las células de los músculos, los tendones y los ligamientos se mantienen con proteínas, siendo necesarias para su crecimiento y desarrollo. Del mismo modo ayudan en los procesos metabólicos e intervienen en el crecimiento de los organismos de igual manera en la renovación celular. Díaz, Semprún y Gualtieri (2003).

La soya con alto contenido proteico, incorporada en el procesamiento de alimento balanceado para animal es un cultivo de enorme importancia económica y social en Venezuela; la misma posee un alto nivel de consumo cercano a las 1,7 millones de toneladas según FAO (FAOSTAT, 2016), su producción en el país no ha sido suficiente, razón que lleva a importar cerca de dos millones de toneladas entre granos, tortas y grasas y para satisfacer las necesidades de este cultivo se requiere sembrar más de un millón de hectáreas lo que indica una alta fuga de divisas. Alezones y Ortiz (2017).

A este respecto, las empresas dedicadas a la fabricación de alimentos balanceados para animales tienen la necesidad de implementar nuevas estrategias para solucionar el problema de obtención de la soya y el campo biotecnológico ofrece

diversas alternativas dirigidos a dar valor agregado a los residuos obtenidos en los diferentes procesos y enfocado además a preservar el medio ambiente.

Los desechos industriales y los subproductos generados en los procesos alimenticios ricos en carbohidratos son aprovechados para darle valor agregado por la vía biotecnológica; usando los mismos como sustratos ideales para los microorganismos para obtención de proteínas unicelular. La producción de biomasa de origen unicelular tiene aplicaciones como suplemento proteico en la alimentación animal. Zumbado, Esquivel y Wong (2006).

En Venezuela, uno de los residuos agroindustriales producido masivamente y que tiene fácil adquisición es el que se genera durante el proceso de pasta alimenticia, teniendo como limitación para el consumo humano la humedad alta que la hace vulnerable para el crecimiento microbiano. Este residuo representa un 0,2 % (600 ton/anuales) de la producción de pasta alimenticia y está compuesta principalmente por almidón (72 %) y proteínas (11,96 %). Domínguez, Bertsch, Mazzani, Luzón y Vasco. de Basillio, (2011).

En este trabajo, se pretende producir proteína unicelular usando como microorganismo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, empleando pasta alimenticia no comercial que se someterá a caracterización y una vez que se obtenga el porcentaje de almidones contenidos en el sustrato; se le realizara hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida en función de la cantidad de almidones presente.

Para la producción de biomasa, se tiene previsto evaluar tres tratamientos: melaza, pasta tratada enzimáticamente, pasta tratada químicamente y definir así cuál de los tres tratamientos es el mejor y ofrecerlo como vía tecnológica para que se cubra una necesidad de sustituir una materia prima de alto contenido proteico de difícil acceso e incorporar en la formulación de alimentos balanceados procesados para animales.

V. EL PROBLEMA

5.1 Planteamiento del problema

VITALIM C.A es una empresa dedicada a la producción y comercialización de alimentos concentrados y balanceados para el consumo animal. Cuenta con dos plantas la primera llamada Planta principal dedicada a procesar alimentos para vaca lechera, bovino y para equino y la segunda llamada Pet Food donde se produce extruido para caninos y para cachama.

Actualmente, la planta posee seis líneas de producción, pero solo dos líneas están actualmente activas paralizando las otras, puesto que la empresa tiene acceso limitado para la adquisición de la materia prima con elevado valor proteico; una de ellas es la harina de soya indispensable para el desarrollo de la formula destinada a la buena nutrición de los animales y que mayormente se adquiere en el extranjero, siendo una materia prima difícil de adquirir por la poca producción nacional y la falta de divisa que se presenta en el país.

Es así como se estableció que era imprescindible desarrollar un estudio basado en la necesidad de la producción de biomasa usando como microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* y la pasta alimenticia no comercial de descarte (suministrada por la misma empresa) utilizada como sustrato previamente sometida a tratamiento para obtener azúcares reductores para que la levadura la metabolice en su reproducción celular bajo condiciones controladas y la transforme en biomasa rica en proteína.

Es de gran importancia destacar que, el sustrato que se usará en este estudio es la pasta alimenticia hecha de la sémola de trigo durum, la cual proviene de los descartes generados por una empresa que elabora pasta alimenticia de la misma organización a la que pertenece la agroindustria previamente mencionada y es descartada para el

consumo humano por no cumplir con las especificaciones de calidad para su aceptación, pero que posee las características idóneas para la alimentación animal por tener carbohidratos y proteínas que le dan las condiciones para ser incorporada en la fórmulas de los alimentos balanceados para animales.

Se le puede dar vía biotecnológica a este valor agregado y obtener aportes económicos más elevados al ser usada como sustrato para la obtención de biomasa; situación que va a contribuir colocando en la mesa de oportunidades una alternativa que ayude a solventar la dificultad existente de importación de proteína importante en la fabricación de alimentos balanceados para animales.

Por consiguiente, esta propuesta de alcanzar el éxito de la investigación a desarrollar, permitirá a la empresa disponer de una opción adicional a los dos productos que hoy día desarrollan y le abre la posibilidad de recuperar todas las líneas con las que cuenta y expandir el mercado de ventas para otros alimentos que bajo condiciones normales acostumbra a ofrecer y que va destinado al ganado vacuno lechero, al equino, y a las cachamas.

Finalmente, es de gran importancia acotar que trae una serie de desventajas el no llevar a cabo dicha propuestas entre estas consolidarse en el mercado, pérdida de cliente, proporcionar seguridad alimentaria.

5.2 Formulación del problema

Una vez ya expuesto los argumentos conlleva a la necesidad de formular el problema de la siguiente forma:

¿Permitirá el proceso biotecnológico de producción de proteína unicelular mediante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisia* e hidrólisis enzimática de almidón de la pasta alimenticia incrementar significativamente el nivel de proteína?

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Producir proteína unicelular a partir de pasta alimenticia no comercial de descarte utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la pasta alimenticia para identificar su composición nutricional.
- Determinar las condiciones óptimas de hidrólisis de enzima alfa amilasa y pululanasa en la hidrólisis de almidón.
- Determinar mediante análisis de varianza los tratamientos: 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática y 3. Hidrólisis ácida como sustrato en la producción de biomasa por la *Saccharomyces cerevisiae* que tratamiento es mejor en la producción de biomasa.

VII. JUSTIFICACIÓN

Se necesita dar soluciones a los problemas de obtención de materia prima con alto porcentaje proteico, dicho problema originado en la empresa durante estos últimos años siendo un principal suplemento nutritivo en la fabricación de alimentos balanceados para animales de granja, ganado vacuno, equino e incluso mascotas.

Por su parte, el aporte proteico es el principal ingrediente que se considera en el diseño del alimento para animales a través de los alimentos balanceados bien sea bajo la forma de peletizados, harinas o extruido.

Ahora bien, la importancia de la proteína en la nutrición radica en que ella aporta los aminoácidos esenciales y no esenciales para las rutas metabólicas utilizadas a nivel celular bien sea para síntesis de proteína que son necesaria para la conformación estructural lo cual se suma con la ganancia en peso, así como la síntesis de las enzimas imprescindible en los procesos metabólicos, todo esto se refleja en animales más robusto en corto tiempo, mayor producción de leche y carne y mantener animales más sanos.

Es por eso que, la importancia de producir proteína ha estado siempre enfocada en las investigaciones biotecnológica desde tiempos remotos, por la importancia nutricional y orgánica para el individuo y seres humanos en general.

De allí pues, que la utilización de la biotecnología como herramienta de producción utilizando fuentes económicas y bajo condiciones controladas y en tiempo más rápido que los métodos convencionales suministra la necesidad de trabajar en esta línea de investigación, donde el microorganismo es de fácil ubicación, el sustrato es un subproducto económico y que la vía biotecnológica permite trabajar bajo condiciones controladas de temperatura, concentraciones, pH, equipos, en fin una serie de ventajas que hace de la investigación un atractivo de desarrollo.

Por consiguiente, el uso de la pasta alimenticia que es rechazada a nivel de línea de producción por no cumplir con las especificaciones de calidad en la línea constituye una fuente de alto valor energético el cual puede ser utilizado como fuente nutritiva.

Cabe destacar que, este sustrato está conformado por almidones y deben ser sometidos a un tratamiento previo al proceso de producción de biomasa para obtener azúcares reductores y de esta manera darle a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* las condiciones que permitan una alta tasa de reproducción celular y consecuentemente un mayor contenido de biomasa.

En resumen, se requiere de un estudio que permita validar la factibilidad técnica de producir fuentes proteicas alternativas, vía biotecnológica, en virtud de aprovechar subproductos industriales baratos, frente a las fuentes importadoras como harina de soya de alto costo y cuya adquisición se dificulta cada vez más.

VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

8.1. Antecedentes

Se señalan algunas publicaciones que, por su asociación con el contenido del presente estudio, sirvió de base para la orientación de la investigación.

Se desarrolló una investigación acerca del efecto del agua contenida y el tamaño de partículas en la digestibilidad del almidón de fracciones molidas in vitro. Se obtuvo tres fracciones de partículas molidas de 0,15 mm, 0,25 mm y 0,5 mm la cual de 36 % disminuyó a 25 % después de someter el almidón a calentamiento en un 27,2 % de humedad y las partículas fueron poco percibida después de someter el almidón al calor con un elevado contenido de agua. Guo, Yu, Wang Shujun y Wang Shuo (2017).

Asimismo, estos investigadores reportaron que el contenido de agua es de gran importancia en la interrupción de la estructura del almidón y consideran que el tamaño de la partícula tiene mayor digestibilidad en el almidón in vitro. En sus resultados obtenidos hubo pequeñas diferencias en el contenido de lípidos crudos entre las fracciones molidas y estas diferencias en la composición química pueden tener influencia susceptible en el tratamiento térmico y en la digestión de la enzima.

Finalmente, se demostró que las diferencias en radios de absorbancia para las tres fracciones de harinas analizadas con diferentes tamaños de partículas tuvieron poco efecto sobre la interrupción del rango corto en el almidón sometido a calentamiento. Los rangos de absorbancia aumentaron con el incremento del tamaño de las partículas en cada muestra lo que indicó que la fracción de harina con el tamaño de partícula larga obtuvo más resistencia en la interrupción de los rangos cortos en el almidón durante el calentamiento.

Se produjo glucosa a partir de almidón de yuca mediante hidrólisis enzimática, con el uso de dos tipos diferentes de enzimas (alfa amilasa y glucoamilasa) obtenidas de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Aspergillus oryzae*. En este estudio se evaluaron diferentes variables como pH, concentración de sustrato y temperatura y se logró establecer un estándar de condiciones de proceso para alcanzar las condiciones más idóneas ver tabla 1. Mera y Carrera (2005).

Tabla 1
Caracterización de las enzimas alfa amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de la yuca

	Alfa amilasa	Glucoamilasa
pH	6,0	5,5
Temperatura	70 °C	60 °C
Concentración	0,1%	0,25 %
Enzima	(g enz/g sust.)	(g enz/g sust.)

Fuente: Mera y Carrera (2005).

Se usó harina de trigo y se analizó la influencia del pH, temperatura, la concentración inicial de sustrato y la relación enzima/sustrato, se usaron la enzima alfa amilasa de *A. oryzae* y se estudiaron las cinética del proceso para determinar los azúcares reductores presente en la suspensión. González, Camacho, Robles y Morales (1990).

También, demostraron que el pH óptimo estuvo entre 5 y 6 y la temperatura más idónea fue de 50 °C en la hidrólisis enzimática desarrollada, donde también comprobaron que la velocidad de reacción fue aumentando para un mismo tiempo de hidrólisis, mientras lo hacia la concentración inicial de la harina de trigo y la relación enzima/sustrato.

Como se indicó, en este estudio se produjo etanol a partir de un jarabe glucosado de residuos de papa, naranja y yuca por cultivo discontinuo, empleando la levadura *S. cerevisiae*. El sustrato estudiado fue sometido a hidrólisis química con ácido clorhídrico a 75 °C durante 8 horas para el rompimiento de enlaces y obtener los azúcares reductores para el metabolismo de la levadura en el proceso de fermentación. Quintero et al. (2015).

En esta referencia se estudió el trigo durum, fue caracterizado y se implementó isoamilasa 1 transgénica y se verificó su comportamiento en el gránulo, asimismo se demostró que el contenido de los polisacáridos del endospermo transgénico fue diferente al que se encuentra presente de forma natural en el trigo, incluyendo una reducción en el contenido de almidón. La ruptura de las cadenas de la amilopectina presente en el endospermo transgénico fue más fácil después de la hidrólisis ácida la cual esta interrumpió su estructura cristalina. Sestili et al. (2016).

Estos investigadores también demostraron que, en el tratamiento de hidrólisis ácida con HCL a 38 °C por 12 horas de los gránulos del trigo durum en la estructura interna de la amilopectina fue menos compacta en el trigo transgénico que el trigo nativo. Además, el tratamiento ácido atacó la superficie del gránulo, en particular las áreas amorfas, seguido por el interior de las regiones cristalinas.

Este estudio se basa en la utilización de los desechos generados durante el empaclado de harina de maíz y obtuvieron de la caracterización un valor de 78,55% de almidón y de proteína cruda 7,8%, para enriquecerlos en proteínas microbianas, implementando un proceso de fermentación líquida. Asimismo, el desecho fue sometido a tratamiento enzimático y tratamiento químico para tratar los almidones y convertirlos en azúcares reductores por las levaduras y luego de la hidrólisis se

realizó una fermentación usando *S. cerevisiae* donde hubo un incremento proteico de 7.8 a 41.13%. Gualtieri y Sánchez (2003).

Tabla 2
Características de la biomasa obtenida por tratamiento enzimático con el consorcio formado por *Sch. Casteli* y *S. cerevisiae*

Hora	Almidón g/l	Peso seco %	Cenizas %	Proteínas % Sobrenadante	Sedimento	Células/ml (x10)	Act Amilasa (UA/ml)
0	20.00	17.0	17.1	2.18	6.56	0.4	0
4	19.40	15.9	15.4	3.72	7.22	0.5	0
8	17.90	10.95	10.6	12.25	8.53	0.6	0
12	15.86	9.05	9.05	15.31	9.63	0.8	0
16	11.44	8.0	8.0	13.34	10.28	1.0	0
20	10.12	5.8	5.8	7.88	17.5	1.12	0.45
24	8.64	5.0	5.0	4.15	22.56	7.76	0.66
28	7.46	4.6	4.6	2.63	24.93	12.6	2.66
32	5.57	4.2	4.2	1.96	25.15	15.4	4.0

Fuente: Gualtieri y Sánchez (2003).

En esta investigación se estudió los residuos húmedos de una pasta alimenticia que no cumplió con especificaciones de calidad para consumo humano, fue caracterizada y obtuvieron un valor de 79,96% de almidón y 11,96% de proteínas. De este sustrato se obtuvo un aditivo microbiano y se caracterizaron las propiedades nutricionales, enzimáticas y ocratoxigenicas de estos aditivos enzimáticos obtenidos, usando un proceso de fermentación empleando los microorganismos *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* en un cocultivo. Domínguez et al. (2011).

De igual manera, durante la fermentación se observó la disminución del contenido de almidón en un 88,89% y el incremento de la cantidad de glucosa en el caldo de 93,47%

durante la hidrólisis enzimática. El almidón fue hidrolizado a glucosa por la acción de las enzimas amilolíticas excretada por *A. niger* durante la fermentación.

Los autores antes mencionados evidenciaron que, durante las primeras 20 horas, el cultivo de *S. cerevisiae* hidrolizó el 99% del almidón inicialmente presente en el medio de cultivo, Sin embargo, en el caso del monocultivo aun a las 48 horas, permanecieron azúcares no hidrolizados en el caldo de cultivo. Ver figura 1.

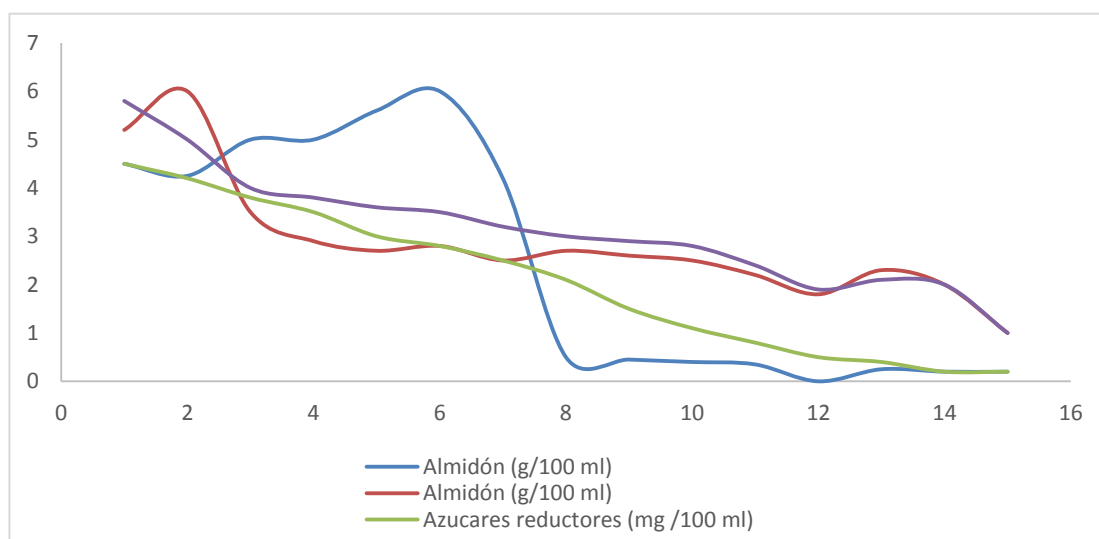


Figura 1. Hidrólisis del almidón, variación en la concentración de azúcares reductores durante el proceso de fermentación microbiana.

Fuente: Domínguez et al. (2011).

Tabla 3
Composición físico-química y propiedades enzimáticas de la pasta húmeda y del aditivo microbiano.

Parámetro% (Base seca)	Sustrato (desecho del pastificio)	Aditivo microbiano
Almidón	79,96	23,68
Proteína	11,96	38,50
Azúcares reductores	4,13	27,6
Grasa	2,28	2,98
Fibra	0,73	1,93
Cenizas	0,94	5,20
Actividad alfa amilasa	-	16.000,00
Actividad glucoamilasa	-	5.328,6

Fuente: Domínguez et al. (2011).

Estos autores centraron su investigación en la producción de biomasa de levaduras por proceso de fermentación aeróbica usando residuos de la pulpa de café, en la cual, se le realizó hidrólisis ácida con una solución de ácido sulfúrico. Gualtieri et al. (2007).

Los microorganismos que se emplearon fueron *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* en diferentes medios de producción. Se obtuvo como resultado 10g/l de biomasa y se incrementó las proteínas de 7,39 a 42,5%.

El mayor crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo pasada las 8 horas de crecimiento celular en el medio de cultivo constituido por el hidrolizado de café, urea, fosfato ácido de potasio y extracto de malta y se alcanzó una población final de $4,9 \times 10^5$ células/ml como se muestra en la figura 2.

Los autores demostraron que, los residuos de pulpa de café hidrolizados tienen las características adecuada como nutriente para usarlos en *S. cerevisiae*, con abundante crecimiento celular, con un alto contenido proteico.

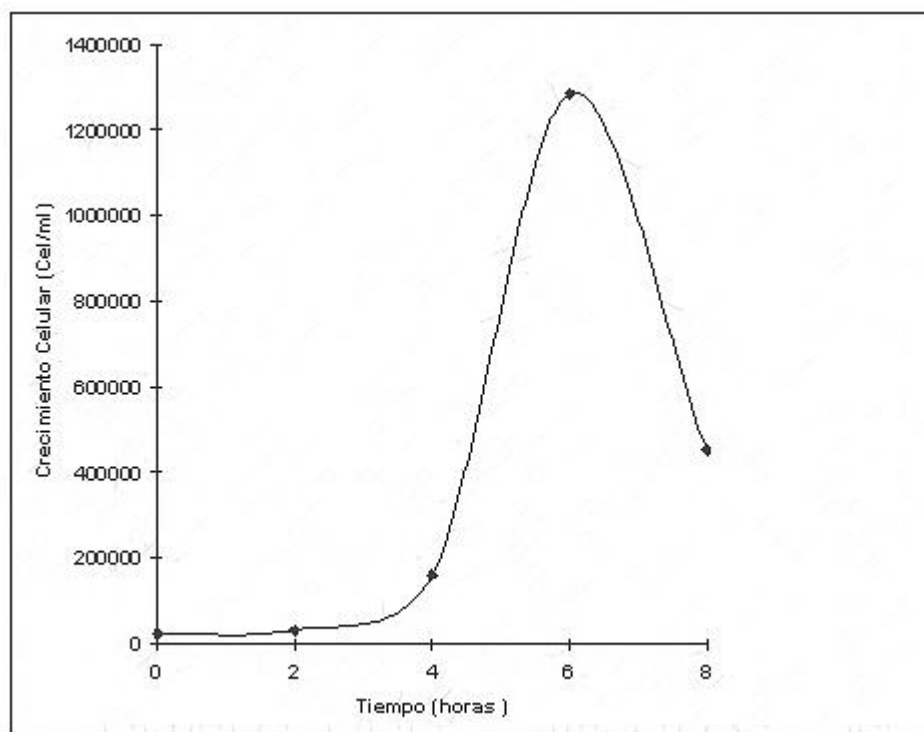


Figura 2. Crecimiento de *S. cerevisiae* con extracto ácido de café, Urea, K_2HPO_4 , extracto de malta líquido, melaza.

Fuente: Gualtieri et al. (2007).

Este estudio se basó sobre la producción de proteína unicelular usando como sustrato desechos agroindustriales bagazo de caña previamente hidrolizado, usando como microorganismos las levaduras *S. Cerevisiae* y *C. utilis* y se evaluó la composición de las levaduras y proteínas total producida. En esta investigación se reflejó una levadura con un metabolismo respiratorio la cual, al caracterizarla a

materia seca se obtuvo más del 40% de contenido proteico. Gutiérrez y Gomes (2008)

En la tabla 4 se muestra un mayor contenido de proteína total que lo obtuvo *C. utilis* con 49% y la *S. cerevisiae* presento 45%.

Tabla 4
Caracterización de las levaduras *C. utilis* y *S. cerevisiae* en base seca.

Componente %	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>
Materia seca	90%	93%
Proteínas	45%	49%
Fibra	2%	3%
Grasa	0.5%	0.3%
Cenizas	5%	0.6%
Minerales	39%	35%
Calcio	0.2%	0.3%
Fósforo	1%	1%
Magnesio	0.2%	0.3%

Fuente: Gutiérrez y Gomes (2008).

Estos investigadores estudiaron como sustrato suero de queso y los microorganismos *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir* y *Saccharomyces cerevisiae* para luego recomendar la levadura con el mejor resultado en producción de biomasa, se determinó el tiempo de fermentación, la productividad total y el contenido de proteína de la biomasa. La temperatura se controló a través del empleo de una incubadora que se ajustó a la temperatura del proceso. Zumbado, Esquivel y Wong (2006).

Tabla 5

Tiempo para alcanzar la fase estacionaria en la curva de crecimiento en suero de queso, para *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida kefyr*. Costa Rica, abril 2004- marzo 2005.

Levaduras	Tiempo (horas)	Intervalo de confianza al 95% (+/-)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	19 a	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24 b	2
<i>Candida kefyr</i>	18 a	1

Fuente: Zumbado et al. (2006).

Dónde:

a: dos variables tienen mismo significado.

b: variable no tiene mismo significado a las otras.

Por lo tanto, se pudo tomar como aporte esta referencia el comportamiento de los microorganismos en función del tiempo y a su vez ver las condiciones de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se demostró a través de la evaluación de los sustratos melaza de caña y suero lácteo que son un excelente sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, del mismo modo les sirvió para ajustar los valores de crecimiento del microorganismo sobre los medios de cultivos de los sustratos mencionados. La biomasa producida cada hora de crecimiento fue cuantificada por medio de la técnica de la cámara Neubauer y a su vez se evaluó los parámetros pH, °Brix en los medios de cultivos a través del tiempo. Aguilar et al. (2015).

Se evaluó la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* cepa nativa y se comparó esta cepa con una comercial reconocida como probiótico, ellos probaron diferentes concentraciones de sustrato (10%, 20%,

30%(p/v) con el objeto de determinar la concentración ideal para obtener mayor producción de biomasa. Fajardo y Sarmiento (2007)

Estos investigadores demostraron que, la concentración ideal de sustrato fue de 20% con pH inicial de 5,0 temperaturas de 30 ° C, 150 rpm, durante 20 horas, siendo un medio altamente productivo.

8.2 Marco Teórico

8.2.1 La pasta Alimenticia

La pasta alimenticia es definida como el producto que se obtiene mediante el secado apropiado de las figuras formadas por la trefilación o laminación y prensado de la masa preparada con sémola de trigo, harina de trigo o mezclas de ambas, agua potable con la incorporación de uno o más ingredientes. Extraído de la norma venezolana 283, Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN (1994).

La pasta alimenticia debe poseer características deseables tanto para el fabricante como para el consumidor tales como: apariencia, elasticidad, sabor y que sea resistente al quebrado durante el corte, envasado, manejo y transporte, también es importante que soporte el rigor de la cocción y que satisfaga el paladar del comensal. Estos parámetros son estimados para evaluar la calidad de la pasta. Carrasquero (2009).

La harina es la responsable del 95 a 98% de los sólidos en las pastas secas, en cuanto a la sémola de trigo durum tienen pocas partículas pequeñas con aspecto más compacto y los gránulos de almidón están completamente encerrados en una matriz amorfa de proteínas. Martínez (2010).

8.2.2 Pasta alimenticia de sémola Durum y harina de trigo

Es el producto definido en 3.1 elaborado con sémola de durum y harina de trigo mezcladas en diferentes porciones. Norma venezolana 283, COVENIN (1994).

8.2.3 Pasta alimenticia de sémola y harina de trigo

Del mismo esta norma establece que la pasta alimenticia es elaborada con sémola y harina de trigo mezcladas en diferentes porciones.

8.2.4 Clasificación

Según lo establecido en la norma venezolana la pasta se clasifica en:

- Pastas Alimentación simples
- Pastas Alimenticias de sémola durum
- Pastas Alimenticias de sémola
- Pastas Alimenticia de sémola durum y sémola
- Pastas de harina de trigo
- Pastas Alimenticia de sémola durum y harina de trigo

8.2.5 Descripción de la pasta alimenticia no comercial de descarte

Este es un producto que por las diversas fallas que presenta en el proceso no puede ser comercializado por ejemplo, quemaduras por altas temperaturas, gran cantidad de puntos blancos, exceso de humedad, recortes de pastas, normalmente es usado como materia energéticas por su gran contenido de carbohidratos en alimentos balanceados para animales de granja.

Un secado inadecuado puede dañar la estructura de la pasta, causando sobre elongación, grietas, deformación y división de las hebras, con los problemas durante la manipulación y envasados que estos defectos generan. Del mismo modo, las propiedades de cocción y de la textura pueden ser afectadas. Y estas características

generadas de la pasta puede ser de no conformidad para el consumo humano. Martínez (2010).

Tabla 6
Composición nutricional de la pasta alimenticia.

Sustancias	Peso % por cada 100 g de producto
Proteínas	13 – 14 g
Carbohidratos Totales	74,0 g
Cenizas	0,78 g
Fibra	0,47 g
Humedad	11%

Fuente: Información obtenida de la etiqueta de la pasta alimenticia Marca Sindoni.

8.2.6 Almidón. Generalidades

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por las plantas, siendo así una fuente principal de energía para todos los organismos vivientes. El almidón es un componente que se encuentra en diversos números de productos agroalimentarios como el cereal (maíz, arroz y trigo). Cruz (2012).

El almidón, es un polímero de glucosa unido por enlaces glucósidos. Este enlace es estable a pH alto pero hidrolizado a pH bajo. Al final de la cadena polimérica se encuentra un grupo aldehído conocido como el grupo reductor. Peña, Molina y Torres (2009).

Como se indica en la referencia el almidón es una mezcla de amilopectina y amilosa, siendo una estructura compleja, con ramificaciones y diferentes enlaces, alfa (1,4) y alfa (1,6) que son hidrolizados por distintas enzimas. Martínez Gallegos (2005).

8.2.7 Amilosa

La amilosa es una molécula esencialmente lineal, las unidades de D-glucosa se encuentran como anillos piranos unidos por enlaces alfa (1,4), la unidad de disacárido que se repite es la maltosa. El peso molecular varía según su clase botánica, en la forma como se aísla y el método utilizado. Cruz (2012).

8.2.8 Amilopectina

La amilopectina es un polisacárido cuyas cadenas principales son restos de glucosa unidos en alfa (1,4) como se encuentra en la amilosa, también presenta eventualmente ramificaciones alfa (1,6). Su peso molecular es muy alto la cual, algunas fracciones alcanzan hasta 200 millones de daltons, constituye alrededor de 75% de los almidones más comunes. Espita (2009).

8.2.9 Enzimas

Las enzimas implementadas como catalizadores biológicos tienen características como lo son: proteínas específicas para cada sustrato, presentan actividad catalítica mayor a otros catalizadores, tienen la cualidad de incrementar la velocidad de reacción, su máxima eficacia es a temperaturas cercanas a los 30 °C y en bajas concentración es de reactivos, no producen productos secundarios y se autorregulan en respuesta a cambios de concentración de reactivos o productos y tienen una conformación flexible. Sosa (2015).

8.2.10 Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis producen azúcares que son utilizados por los microorganismos; en la hidrólisis enzimática por acción de las enzimas las comunes son alfa y beta

amilasa. Para obtener una mayor efectividad en la hidrólisis enzimática del almidón por las amilasas es más favorable que este gelatinizado. Reyna, Robles, Reyes, Mendoza y Romero (2004).

Durante la hidrólisis enzimática se rompe los enlaces alfa (1,4) y alfa (1,6) presentes en el almidón para liberar cadenas más cortas: dextrinas, maltosa y glucosa. Asimismo, las enzimas actúan específicamente sobre un tipo de enlaces o en algunos casos sobre dos. Martínez Gallegos (2005).

Reacción de la hidrolisis



8.2.11 Alfa amilasa

Esta enzima pertenece a la familia 13 glicosil (GH 13), en esta familia se comparte un grupo de características comunes así como, la estructura (β/α)8 barril, la hidrólisis o formación de enlaces alfa glucósido y un número de aminoácidos definido en el sitio activo. Peña et al. (2009).

La alfa amilasa también conocida como alfa (1,4) glucanohidrolasa; EC 3.2.1.1 es una glucanasa activa que catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces alfa (1,4) glicosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina excepto en las proximidades de los puntos de ramificación. Cruz (2012).

Las evidencias anteriores, también señalaron que la hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por cuatro o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces alfa (1,6) proveniente de las uniones glucosídicas de

la estructura original. Los productos obtenidos en mayor concentración son maltosa, maltotriosa y maltopentosa, hidrolizando completamente la maltohexosa.

La alfa amilasa bacteriana (*Bacillus*) es termoestables y puede usarse entre 80 a 110°C y pH de 5 a 7 con concentración de Ca^{2+} de 5 a 60 ppm y las enzimas de origen fúngico tienen condiciones óptimas de 50 a 70°C, trabaja a pH de 4 a 5 y con concentraciones de Ca^{2+} aproximadamente de 50 ppm. Sosa (2015).

8.2.12 Pululanasa

Esta enzima también es conocida como pululan -6- glucanohidrolasa, EC: 3.2.1.41 hidroliza los enlaces glucosídicos alfa (1,6) en el pululan y tiene como producto principal la maltotriosa y maltosa e hidroliza el almidón para dar un producto principal como lo es la maltosa. La pululanasa es usada como enzima complementaria para la hidrólisis de amilopectina junto con la alfa amilasa. Cruz (2012).

Como también reportaron estos investigadores, existen dos tipos de enzimas pululanosas; la pululanasa de tipo I la cual, esta solo hidroliza los alfa (1,6) del pululan y la enzima pululanasa de tipo II hidroliza los enlaces alfa (1,6) en el pululan como también los enlaces alfa (1,4) de otros polisacáridos. Esta enzima tiene un peso molecular que fluctúa entre 70 y 110 KaDa.

La pululanasa tiene una aplicación destinada a alimentos, elaboración de cerveza e industria farmacéutica, no obstante estudios recientes han probado que solo se aprovechan algunas de estas enzimas con características deseables para la aplicación industrial. La inclusión de la pululanasa durante la hidrólisis del almidón puede reducir la cantidad de glucoamilasa requerida, el tiempo de reacción y mejora los rendimientos. Wang X., Nie y Xu (2019).

8.2.13 Hidrólisis Química. Método químico

El almidón puede ser hidrolizado por ácidos como el ácido clorhídrico (hidrólisis ácida) y llega a una conversión parcial del almidón a D- glucosa. Del mismo modo, este método es implementado para obtener jarabes de glucosa a partir de suspensiones que contienen 20% (p/p) de almidón a pH 2 y a una temperatura de 140 °C. Espitia (2009).

Asimismo, también se reportó que durante la reacción, el ácido penetra por las partes amorfa del grano de almidón e hidroliza los enlaces glucosídicos; sin embargo, el ácido no puede penetrar por las áreas cristalinas, esto puede deberse a causa de la doble hélice permaneciendo por ello intactas. Además, que el efecto principal del ácido es reducir el peso molecular de las moléculas de almidón, quedando intacta la estructura cristalina del grano.

8.2.14 Proteína Unicelular

El término “proteína unicelular”, significa o identifica a los alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares o pluricelulares crecidos por procesos fermentativos en cultivos sumergidos, de diversas fuentes y en desechos orgánicos. También se le conoce como proteína microbiana, biomasa o SCP (Single cell protein). Asimismo, suelen ser producidas por métodos no tradicionales y están asociadas al reciclaje de una gran variedad de desechos biodegradables de valor económico. Gualtieri y Sánchez (2003).

Asimismo, se reportó que debido al alto contenido de proteína que contiene estos microorganismos de un 30 a 50 % de proteína en su composición y la capacidad que tienen de reproducirse en medios muy variados, siempre han sido objeto de estudio y así su final incorporación a la dieta animal y hasta en la humana.

La cantidad de proteína unicelular que se produce depende del tipo de sustrato que se trabaje y su composición. También es muy importante que, se use el sustrato adecuado porque influye directamente en el resultado de la fermentación. Cada tipo de técnica de fermentación tiene que ser optimizado debido a que el organismo reacciona diferente para cada sustrato. Fatemeh, Reihani y Khosravi (2018).

La proteína microbiana es obtenida a partir de algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos que son cultivados para procesos de fermentación en condiciones controladas para así garantizar un desarrollo microbiano deseado y a su vez, aprovechar el sustrato obtenido bien sea de residuos o subproductos agroindustriales como fuente de energía con alto contenido de carbono e hidrogeno. Chacón (2004).

Entre los sustratos para la producción de biomasa en que pueden reproducirse los microorganismos se encuentran algunos desechos agroindustriales ricos en carbohidratos. Ferrer, Davalillo, Chandler y Páez (2004).

8.2.15 Composición general de la biomas microbiana

La biomasa microbiana está compuesta por un porcentaje mayor de 40% de proteína en base seca. Las bacterias presentan el contenido más alto, le sigue las levaduras y las algas. El perfil de aminoácidos esenciales es uno de los factores básicos que se evalúa en la calidad de las proteínas, cuenta con altos valores de lisina pero es deficiente de aminoácidos sulfurados como la cisteína y la metionina muy similar a la proteína de soya. La proteína unicelular obtenida a partir de levaduras está compuesta en un 80 % de aminoácidos, 12 % de ácidos nucleicos y alrededor de 8 % de amonio. Zumbado (2005).

8.2.16 Levadura

Saccharomyces cerevisiae por excelencia es la levaduras más empleada a nivel industrial en procesos fermentativos, debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta un alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, puede trabajar en altas concentraciones de azúcares, presenta elevada viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el proceso posterior. Gómez et al. (2015).

En la alimentación animal la levadura es un producto rico en proteínas y en vitaminas, que no fermenta porque presenta un metabolismo exclusivamente respiratorio sobre sustratos carbonados. Los valores promedios de proteínas, expresados en porcentajes de materia seca, para *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* varía entre 33 al y 45 %. Estas proteínas poseen un alto porcentaje de lisina (del 7 al 9 %) y un bajo porcentaje de aminoácidos azufrados (de 0,7 a 1,7 % de cisteína y de 1 a 2 % de metionina). Ferrer et al. (2004).

8.2.17 *Saccharomyces cerevisiae*. Generalidades

Saccharomyces cerevisiae representa una de las levaduras de primera elección para la producción industrial de biomasa y etanol, y que careciendo de actividad β -galactosidasa, amilasa y glucoamilasa, las levaduras en gemación son incapaces para fermentar el almidón. Gualtieri y Sánchez (2003).

De este modo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee características que son de gran interés. Se encuentran formadas por pared celular, núcleo diferenciado y organelos como ribosomas y mitocondrias, y la formación de una cápsula de

polisacáridos. La *Saccharomyces cerevisiae* posee dimensiones de 2,5 a 10 micras de ancho y 4,5 a 21 micras de largo. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta lactosa. Fajardo y Sarmiento (2007).

Las levaduras son organismos eucariotas, posee diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Clasificadas como hongos unicelulares y por lo general sus células son ovaladas, también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias, se reproducen por fisión binaria o por gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales, son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural. Suárez, Garrido y Guevara (2016).

8.2.18 Requerimientos Nutricionales

La *Saccharomyces cerevisiae* es una colonia de color crema o blanco, con apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares con una temperatura optima de crecimiento de 25 °C a 30 °C y además puede producir ascosporas cuando se le da condiciones nutricionales adecuadas. La producción de esta levadura también va a depender de condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como: carbono, hidrogeno nitrógeno y fosforo. Fajardo y Sarmiento (2007).

8.2.19 Composición química

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente.

Tabla 7
Composición química de las levaduras

Componentes	Porcentaje (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	2

Fuente: Fajardo y Sarmiento (2007).

8.2.20 Factores y condiciones de crecimiento

Principales factores para el desarrollo de la levadura

Las vitaminas que requiere la levadura son: Biotina, tiamina, piridoxina, ácido p-amino benzoico, niacina, ácido fólico, riboflavina, el pH debe estar comprendido entre 5,8 y 6,3, la temperatura esta entre 0 °C y 40 °C con un valor óptimo entre los 28 °C y 35 °C y finalmente la actividad de agua debe ser mayor a 0,6. López y Prado (2015).

8.2.21 Morfología

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular levaduriforme que presenta células alargadas, globosas, elipsoidales con gemaciones o con blastoconidios multilaterales de 3 a 10 x 4,5 -1µ y estas se ven refringente en un microscopio. (Ver figura 3). Presentan ascos con hasta cuatro ascosporas esféricas o elipsoides de pared lisa en su interior. Espitia (2009).

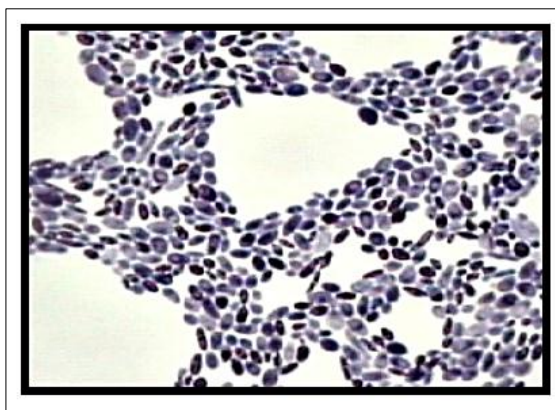


Figura 3. Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: Fajardo y Sarmiento (2007).

8.2.22 Metabolismo Celular

Consiste en las reacciones Redox que ocurren dentro de las células de los organismos vivos para la producción de energía. Comprende los metabolismos de síntesis de formación de enlaces químicos para la elaboración de proteínas, lípidos, coenzimas y polisacáridos y también las degradaciones de compuestos como la digestión, la respiración celular y la fermentación donde se obtienen sustancias más simples y se libera energía. Quintero (2010).

8.2.23 Metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

- **Azúcares**

El metabolismo de la glucosa por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede ser de dos formas respiratoria o fermentativa va depender de las condiciones y del aprovechamiento del sustrato con el adecuado y continuo adicionamiento de suplementos de minerales, nitrógeno, y los factores de crecimientos. La producción de levadura cuando es en condiciones aeróbica puede eliminar o minimizar la producción de etanol. Daramola y Zampraka (2007).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo que puede llevar a cabo un metabolismo respiratorio o fermentativo basado en la concentración de oxígeno. Asimismo, en condiciones aeróbicas aumenta la biomasa y produce poco alcohol y a su vez el oxígeno es aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa durante la respiración. Buitrago y Tenjo (2007).

La principal fuente de carbono y energía para la *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aerobias es una valor de 50% que se incorpora a biomasa y el 50% restante es utilizada como fuente de energía bajo procesos de oxidación. Bajo condiciones anaerobias solo un 30% es incorporado a biomasa. Cardozo y Moreno (2012).

La concentración de la fuente de carbono usada como sustrato esta alrededor de 4 a 192 g/l la cual produce de 19,8 a 23 g/l para el rendimiento de biomasa. Fatemeh et al. (2018).

Cuando la levadura está en presencia de suficiente oxígeno y de la cantidad de sustrato adecuado diluido, ellas consumen los azúcares para el crecimiento de las células y para su reproducción Espitia (2009).

- **Nitrógeno**

La levadura tiene preferencia por los compuestos nitrogenados con fácil difusión a través de la membrana celular, sobre todo los aminoácidos, sus amidas, la urea y las bases hexónicas. De este modo, cuando las sales de amonio entran a la célula allí se disocia y libera ácido sulfúrico lesionando así la pared celular y a su vez las otras sales sirven para neutralizar la acción de este ácido. Espitia (2009).

Asimismo, el medio de cultivo de estar alcalino pasa a ser un medio ácido paso que se acelera cuando comienza la degradación de los aminoácidos orgánicos, y la

levadura durante la fermentación toma el nitrógeno de estos compuestos logrando así que los aminoácidos pierda su carácter anfótero hasta convertirse en ácido. La acidez disminuye cuando los ácidos orgánicos han sido metabolizados y la levadura logra asimilar la mayor parte de azúcar y del nitrógeno.

Las fuentes de nitrógeno son unos de los factores más importantes durante la síntesis de proteína por los microorganismos y son los más implementados para el crecimiento que incluye amonio, urea, nitrato y nitrógeno orgánico en diferentes sustratos. En ocasiones se adiciona suplementos minerales para el medio de cultivo cuando es necesario por la deficiencia de nutrientes que se pueda presentar que pueda afectar el crecimiento del microorganismo. Fatemeh et al. (2018).

El nitrógeno constituye entre el 10 y el 14% en peso seco de levadura, se encuentra presente en proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y enzimas. Cardozo y Moreno (2012).

- **Fósforo**

La levadura introduce este elemento a la célula de forma inorgánica y adentro obtiene ácido fosfórico, donde el metabolismo va variar durante el proceso de fermentación. De igual manera, durante todo el proceso el ácido fosfórico permanece entrando y saliendo. Espitia (2009).

El fósforo es incorporado como compuestos inorgánicos (fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio y fosfato de sodio) o como compuestos orgánicos (extracto de levadura) en los medios de cultivo para el crecimiento de la levadura y constituye el 3% en peso seco de la levadura y ayuda a la acumulación de energía, es constituyente de fosfolípidos, vitaminas, DNA y RNA y actúa en la transferencia de energía (ATP). Cardozo y Moreno (2012).

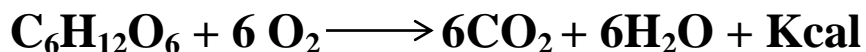
- **Potasio**

Estos mismo investigadores reportaron que el potasio es adicionado en el medio de cultivo como fosfato monobásico de potasio y fosfato de sodio (compuesto inorgánico) y extracto de levadura (compuesto orgánico) para que actúe en los procesos de transporte celular, como regulador de potencial osmótico, también como cofactor enzimático y es necesario en el metabolismo de los carbohidratos.

8.2.24 Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa

La levadura obtiene energía a través de dos metabolismos: Asimilación; proceso donde la levadura toma las sustancias nutritivas que necesita del medio en que se desarrolla. Desasimilación; es donde se degradan los hidratos de carbono incorporado en las células. Asimismo, se distinguen dos formas de desasimilación como lo es la respiración y fermentación. Donde, la respiración es definida como un proceso metabólico que conduce a una oxidación total de los hidratos de carbono incorporados bajo formación de dióxido de carbono, agua energía generando así biomasa. Ver ecuación 1. Fajardo y Sarmiento (2007).

Ecuación 1:



8.2.25 Proceso de producción

Los carbohidratos son los principales fuente de sustrato que se fermentan, pero algunas bacterias pueden fermentar otros compuestos como ácidos orgánicos, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Los azúcares que se fermentan son la glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y la lactosa, la cual se obtienen de la caña de azúcar, la melaza, los jugos de las frutas, de la remolacha. Quintero (2010).

Ahora bien, la fermentación es un proceso típico que es llevado a cabo en un fermentador o en un biorreactor, donde un determinado sustrato que compone el medio de cultivo es transformado por acción microbiana en metabolitos y biomasa. Asimismo, se desarrollan cuatro etapas en el proceso de fermentación como es: la propagación de los cultivos, fermentación, operaciones y proceso de separación y purificación y por ultimo tratamiento de fluentes. Hernández y Acevedo (2013).

El sustrato que se emplea según las características que posea, se suele someter a pretratamientos y depende solo de la naturaleza del medio. Una vez finalizado el proceso de fermentación se procede a la recuperación de la biomasa. Las levaduras se recuperan normalmente por centrifugación. Y por último, se realiza el secado y molienda de la biomasa. Zumbado (2005).

IX. METODOLOGÍA

En este capítulo se desarrolló las respuestas a los objetivos específicos planteados, por medio del estudio de la evaluación de los parámetros cinéticos del crecimiento celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La metodología se desarrolló de la siguiente manera: Caracterización de la pasta, Tratamiento de la pasta (sustrato), evaluación del crecimiento celular.

9.1 Diseño de la investigación

Se recolectaron datos a través de las variables que se midieron durante la fermentación aeróbica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de biomasa, el sustrato previo a su fermentación se sometió a hidrólisis enzimática e hidrólisis química para convertir los almidones presentes en azúcares reductores.

Del mismo modo, se realizó un estudio experimental y se estudió variables independientes (la pasta alimenticia sometida a tratamiento) y el efecto que posee sobre la variable dependiente (levadura) en el proceso fermentativo.

9.2 MATERIALES Y METODOS

9.2.1 Población y muestra

Para el desarrollo de la investigación la población está comprendida por la cantidad de la muestra (pasta alimenticia) que estaba reservada en el almacén de materia prima de la empresa, se destaca que se tomó en cuenta la materia prima que se recibió en la semana seleccionada para el muestreo, es importante considerar que,

por semana se recibe un estimado de 6.000 Kg. Para la recolección de la muestra se empleó el procedimiento de muestreo aleatorio simple probabilístico.

Cabe resaltar, la mayor parte de la experiencia experimental se desarrolló en la Fundación CIEPE y la caracterización de la materia prima en la empresa.

9.3 Plan experimental

9.3.1 Caracterización de la Materia prima pasta alimenticia de sémola de trigo durum y agua.

Como se explicó previamente en la justificación, se aprovechó la pasta alimenticia no comercial destinada a formulación animal de la empresa de alimentos balanceados para animales ya mencionada, se recolectó en bolsas de plástico en condiciones higiénicas. Luego se trasladó a las instalaciones Fundación CIEPE División de Biotecnología de allí fue llevada a planta piloto y se pasó por proceso de molienda en una malla 0.80 mm para dar condiciones físicas para el desarrollo del estudio, finalmente al obtener la textura deseada se trasladó nuevamente a la División de Biotecnología donde se desarrolló el estudio.

Por su parte, la muestra se sometió a caracterización analítica de la materia prima para determinar la composición de proteína, almidón, cenizas, grasa, azúcares totales, y humedad.

9.4 Determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis de la enzima alfa amilasa y pululanasa en la hidrólisis del almidón.

9.4.1 Caracterización de las Enzimas

Para realizar la hidrólisis enzimática del almidón presente en el sustrato, se emplearon dos tipos de enzimas diferentes, a las que se les estudio las condiciones óptimas de concentración, pH, temperatura, tiempo, asimismo cada enzima obtuvo rangos de funcionamiento óptimos distintos.

Se utilizó la enzima alfa amilasa, es una enzima proveniente del hongo *Bacillus Licheniformis*). Valor de pH optimo: 5, Temperatura Optima: 70 °C, tiempo 1 hora. Que hidroliza los enlaces 1,4 alfa glucosídicos del almidón a dextrinas solubles y oligosacáridos.

Se empleó también la enzima Pululanasa de (Sigma) SLBB6227 marca comercial, del *Bacillus subtilis*. Valor de pH óptimo: 50 °C, pH 4 en tiempo de 1 hora.

9.5 Tratamiento enzimático de la pasta alimenticia empleando enzima alfa amilasa y la enzima y pululanasa de Sigma.

9.5.1 Reacción con alfa amilasa

Se adecuó una solución al 5% de almidón de pasta, se incluyó buffer de acetato 0,1 M para ajustar el pH con pHmeter modelo: OAKTON a un valor óptimo, también se incorporó cloruro de calcio; consecutivamente, se adicionó la cantidad de enzima alfa amilasa óptima al 3% de concentración. Posteriormente, se ajustó la temperatura a 70°C y se dejó reaccionar por un margen de 60 min. La hidrólisis se

llevó a cabo en un baño termo- regulado Modelo: THERMO SCIENTIFIC. Se tomó como referencias con algunas modificaciones la metodología expresada por Mera y Carrera (2005).

9.5.2 Reacción con pululanasa

A la solución de almidón se le ajustó el pH con ácido clorhídrico 6 N al valor óptimo; del mismo modo, se agregó la cantidad de la enzima pululanasa concentración óptima al 2%. Seguidamente, se ajustó la temperatura a 50°C y se le dejó reaccionar durante 60 min. La hidrólisis también se desarrolló en un baño termo-regulado y al finalizar la hidrólisis se determinó azúcares reductores por el método de DNS presente en la solución. Del mismo modo que, en la enzima alfa amilasa se consultó la metodología de las referencias antes mencionada.

9.5.3 Desarrollo de la hidrólisis enzimática

Una vez que se culminó el tiempo de reacción se inactivo la enzima alfa amilasa con tratamiento térmico a punto ebullición por 5 minutos, seguidamente, se ajustó de nuevo el pH con ácido clorhídrico 6 N y la temperatura, luego se incorporó la pululanasa y se dejó reaccionar durante el tiempo ya establecido.

9.5.4 Descripción del esquema tecnológico del tratamiento enzimático de la pasta alimenticia empleando enzima alfa amilasa y la enzima y pululanasa de Sigma.

- 1. Acondicionamiento de la muestra:** Una vez que se recolectó la pasta alimenticia se molió, luego se caracterizó; procedimiento que se explicó previamente.

2. **Tratamiento término:** La pasta alimenticia se sometió a tratamiento térmico la cual, se llevó a calor por 3 minutos a 80 °C.
3. **Temperatura ambiente:** La pasta alimenticia luego del tratamiento térmico se llevó a temperatura ambiente (25°C).
4. **Ajuste de pH:** Una vez que la pasta alimenticia se llevó a temperatura ambiente se ajustó pH y se incorporó un buffer de pH 5.
5. **Incorporación de CaCl₂:** Se adicionó CaCl₂ a la a la pasta alimenticia previamente acondicionada.
6. **Incorporación de la Enzima:** Luego de la incorporación de la sal, se adicionó la enzima alfa amilasa con las condiciones preestablecida con anterioridad al sustrato.
7. **Baño de María termo-regulado:** Después que la enzima se incorporó en el sustrato se trabajó a temperatura y agitación establecida.
8. **Inactivación térmica:** Una vez pasado el tiempo de actividad enzimática de la alfa amilasa, se inactivo sometiéndola a tratamiento térmico por 5 minutos.
9. **Incorporación de la Enzima:** Luego de inactivar la enzima alfa amilasa se incorporó la enzima pululanasa en las condiciones ya preestablecida procedimiento que mencionado anteriormente.
10. **Baño de María termo-regulado:** Después que la enzima se incorporó en el sustrato, al igual que la vez pasada esta enzima se trabajó a temperatura y agitación previamente establecida.

- 11. Método de DNS:** Finalmente al culminar el tiempo de actividad enzimática de la pululansa, se determinó los azúcares reductores usando el método de 3,5 dinitrosalicílico.

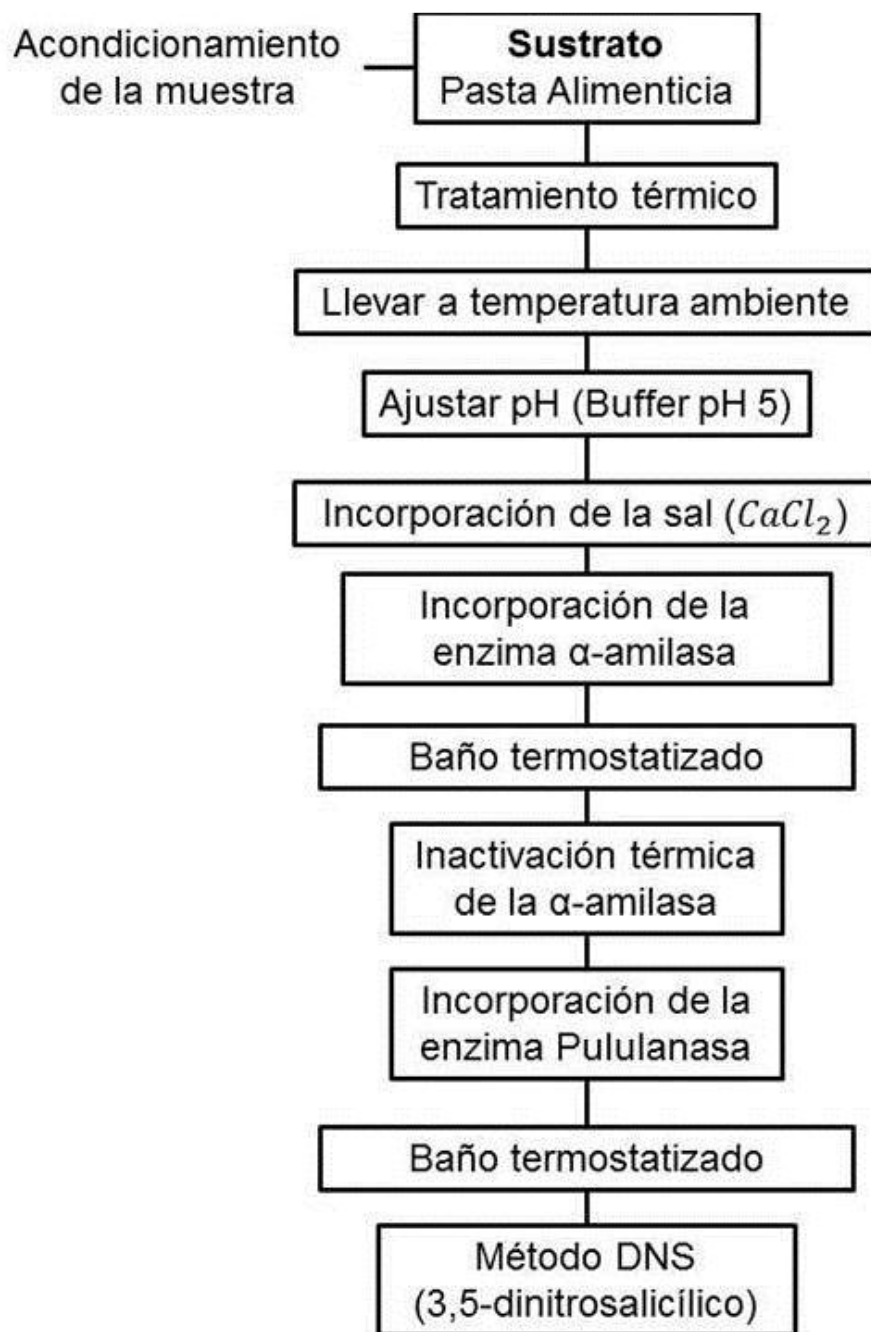


Figura 4. Esquema tecnológico del tratamiento enzimático de la pasta alimenticia empleando enzima α -amilasa y la enzima y pululanasa de Sigma.

9.5.5 Determinación de azúcares totales por el método de DNS. Técnica del ácido 3,5- dinitrosalicílico

Esta técnica es de óxido – reducción que se basa en la capacidad que tiene la glucosa para reducir el ácido 3,5 – dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones, la cual, esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Por lo tanto, se hace lectura de absorbancia en un espectrofotómetro aplicando la Ley de Beer – Lambert. Fajardo y Sarmiento (2007).

Una vez que se culminó la reacción enzimática, se calculó los azúcares reductores utilizando la técnica del dinitrosalicílico método del DNS para cuantificar azúcares reductores; fundamento que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5- dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones; esta reducción producirá una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores.

En un mismo contexto, el método DNS (ácido 3,5 -dinitrosalicílico) se realizó comparando los resultados con una curva patrón de glucosa con distintas concentraciones; con el objetivo de obtener la curva correspondiente para determinar los equivalentes de azúcares reductores.

Cabe destacar que, la solución DNS fue compuesta por 1,0 g de DNS; 1,0 g NaOH; 0,05 de sulfito de sodio; 0,20 g fenol; completando con 100 ml de agua destilada y evitando su exposición a la luz; al reactivo se dejó reposar durante 24 horas luego de su preparación.

Del mismo modo, para la medición de los azúcares se tomó un tubo de ensayo y se incorporó 1 ml del reactivo DNS y 1 ml de la muestra obtenida de proceso de

hidrólisis y producción de biomasa, fue incubada a punto de ebullición durante 5 minutos; posteriormente se frenó la reacción con hielo y se le adiciono 8 ml de agua destilada estéril a la mezcla, se agitó en Vortex Mixer Modelo: VM- 1000.

Para determinar la absorbancia, esta solución fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 575 nm para cada tubo de ensayo.

9.6 Hidrólisis química tratamiento aplicado a la pasta alimenticia

Para el proceso de hidrólisis química se preparó la pasta en una concentración de 5%, posteriormente se adicionó el ácido clorhídrico 6 N de solución de pasta. La solución se llevó a cabo en un baño de María termo-regulado durante el tiempo ya determinado previamente a una temperatura de 80 °C a 100 RPM por tres horas. Se tomó referencia con modificaciones de Quintero et al. (2015).

Una vez que culminó el proceso de hidrólisis se ajustó el pH a 4,5 con NaOH 6 N para acondicionar el medio de cultivo. Luego de la hidrólisis ácida se determinó azúcares reductores por el método de 3,5- dinitrosalicílico.

9.6.1 Esquema tecnológico de la hidrólisis ácida tratamiento aplicado a la pasta alimenticia

- 1. Acondicionamiento de la muestra:** Una vez que se recolectó la pasta, se molió, luego se caracterizó; procedimiento que se explicó previamente.
- 2. Incorporación del ácido:** Luego de acondicionar la pasta, se adicionó el ácido clorhídrico 6 N en las cantidades establecidas.

3. **Tratamiento Térmico:** se sometió a temperatura de 80 °C durante 3 horas.
4. **Temperatura ambiente:** La pasta alimenticia hidrolizada se llevó a temperatura ambiente (25°C) luego del tratamiento térmico.
5. **Método de DNS:** Finalmente, al culminar el tiempo de la hidrólisis ácida y se llevó a temperatura ambiente, se determinó los azúcares reductores usando el método de 3,5 dinitrosalicílico.

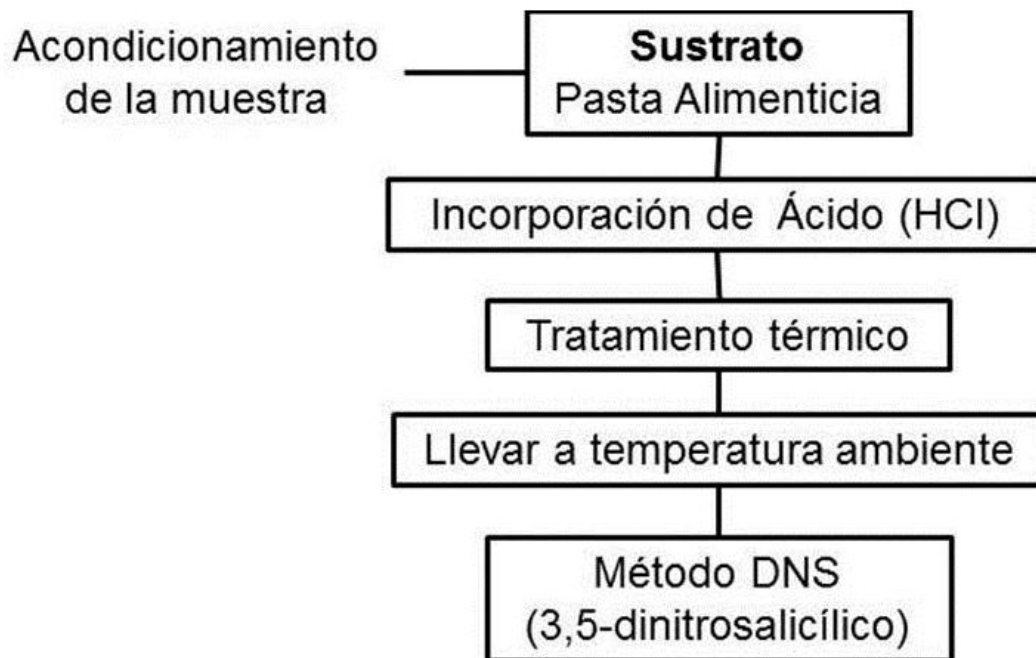


Figura 5. Esquema tecnológico de la hidrólisis ácida tratamiento aplicado a la pasta alimenticia.

9.7 Microorganismo

Saccharomyces cerevisiae, levadura deshidratada que anticipadamente se aisló de cultivos almacenado en el cepario del laboratorio de Biotecnología de la Fundación CIEPE. Almacenado a una temperatura de 4°C Refrigerador Modelo: Thermo.

9.8 Preparación del inóculo *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se cultivó en 200 ml de melaza, suplementada con urea y fosfato dipotásico y se incubó a una temperatura de 30 °C a 150 RPM en una incubadora orbital modelo NBS/ Innova, la incubación se realizó durante 17 horas previa al proceso de producción de biomasa. Del mismo modo, la concentración celular se midió a través de una cámara de Neubauer y se estableció un nivel de $4,58 \times 10^8$ células/ml para la levadura. Se usó como referencia con modificaciones de Zumbado y González (2006).

9.9 Evaluación de los tres tratamientos: 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática 3. Hidrólisis ácida como sustrato en la producción de biomasa por la *Saccharomyces cerevisiae*.

9.9.1 Diseño del medio de cultivo experimental

Se prepararon tres tratamientos, la cual, se partió de azúcares reductores. Con modificaciones ajustada para el estudio de la pasta. Gualtieri et al. (2007).

9.9.2 Condiciones de cultivo aeróbico

Se prepararon tres medios de cultivos diferentes, a partir de melaza, con pasta hidrolizada enzimáticamente y con hidrólisis ácida.

Medio de cultivo con melaza (Control), se preparó la muestra de melaza a 25 °Brix líquido 500 ml, 2,1g de Urea y 1,4g de fosfato monopotásico.

Medio de cultivo de pasta hidrolizada enzimáticamente, se preparó muestra líquida 500 ml, 2,1g de Urea y 1,4g de fosfato monopotásico.

Medio de cultivo de pasta con hidrólisis ácida, se preparó muestra líquida 500 ml, 2,1g de Urea y 1,4g de fosfato monopotásico.

Se agitó para homogenizar, luego se trasvasó 50 ml a 10 fioles de 250 ml, se le colocaron tapones hechos con gasas y se llevaron a esterilización a una temperatura de 121 °C 15 PSI durante 15 minutos.

9.9.3 Producción de biomasa

Luego de la esterilización del sustrato, el pie de cuba de cada uno de los cultivos aeróbicos se representó en un 10 % del volumen final del medio de cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (500ml).

Entonces, se le dio las condiciones al cultivo aeróbico, temperatura de 30 °C, agitación rotatoria de 150 rpm, se adicionó oxígeno filtrado estéril al medio durante todo el proceso, se mantuvo un pH de 4,5. Asimismo, el tiempo a la que fue sometido el cultivo aeróbico fue de 24 horas tiempo estimado en la curva de crecimiento en su fase.

9.9.4 Esquema tecnológico de la evaluación de los tratamientos: 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática, 3. Hidrólisis ácida como sustrato en la producción de biomasa por la *Saccharomyces cerevisiae*.

- 1. Acondicionamiento de la muestra:** Se acondicionó a los tres sustratos, dándole las características adecuada para trabajar la levadura. Asimismo, la melaza se llevó a 25 °Brix y se sometió a tratamiento a la pasta alimenticia como se indicó anteriormente.
- 2. Incorporación de sales:** Se incorporó sales al sustrato como la urea y fosfato monopotásico.
- 3. Esterilización:** Se llevó a autoclave el sustrato suplementado para eliminar carga microbiana a temperatura de 121 °C a 15 PSI durante 15 minutos.
- 4. Ajuste de pH:** Se verificó pH y se ajustó a condiciones específicas para la levadura ya explicado anteriormente.
- 5. Inoculación de la *Saccharomyces cerevisiae*:** Una vez que, se acondicionó los tres sustratos estudiados y se esterilizaron, se procedió a realizar la siembra dándole a la levadura las condiciones necesarias para su crecimiento.
- 6. Incubación:** La incubación se llevó a cabo y se trabajó a temperatura de 30°C a agitación de 150 rpm por 24 horas para el crecimiento de la levadura.
- 7. Medición de variables:** se tomó muestras en tres tiempo es decir, tiempo inicial (0), tiempo (1) 18 horas, tiempo (2) 21 horas y tiempo (3) 24 horas y se determinó densidad óptica, pH, DNS, cámara Neubauer, peso seco y proteína por Lowry.

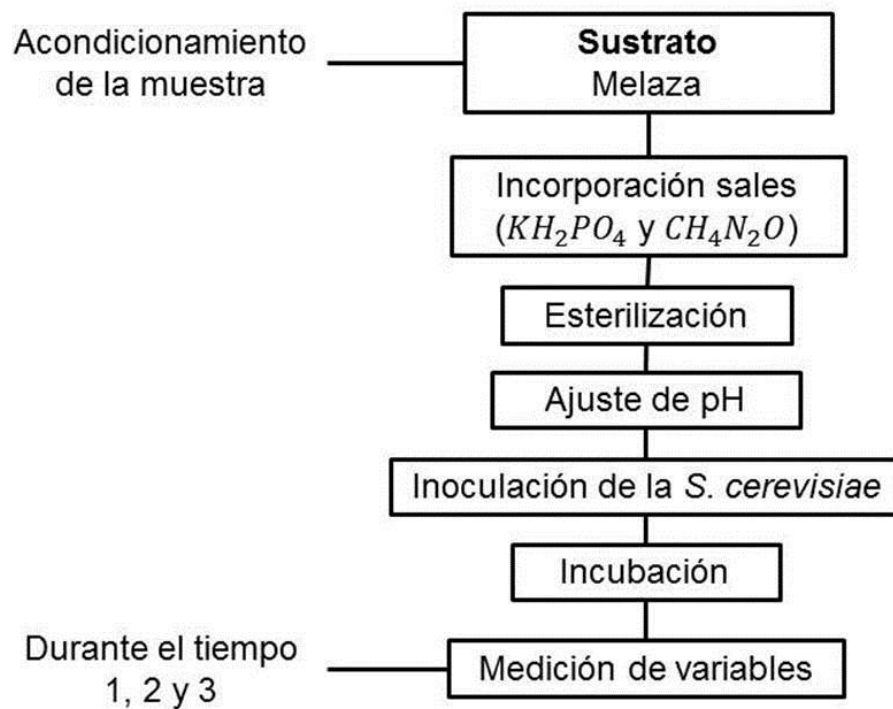


Figura 6. Esquema tecnológico de la producción de biomasa usando melaza como sustrato por la *Saccharomyces cerevisiae*.

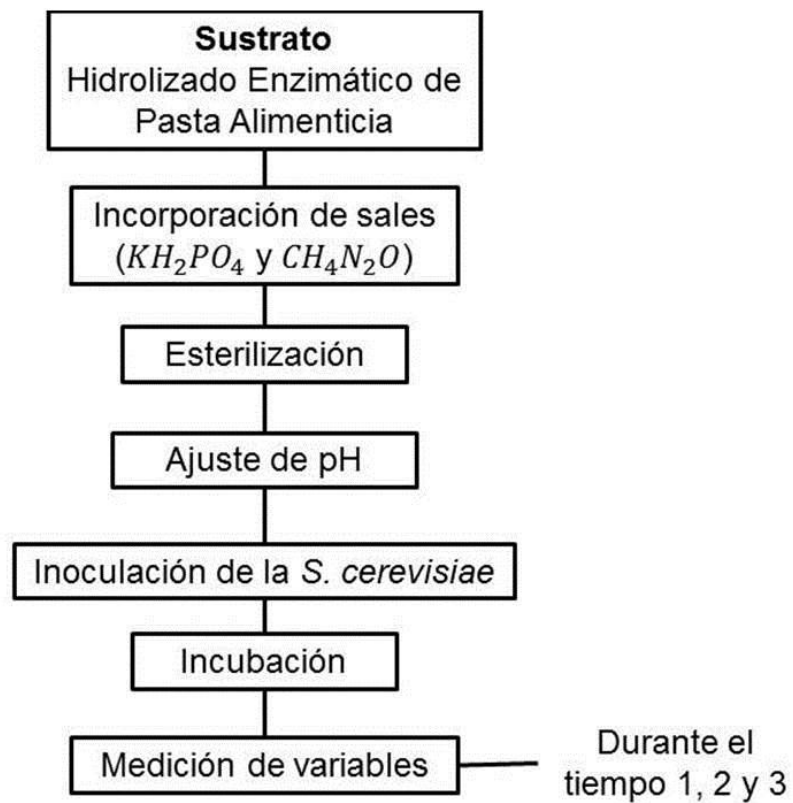


Figura 7. Esquema tecnológico de la producción de biomasa usando la pasta hidrolizada enzimáticamente como sustrato por la *Saccharomyces cerevisiae*.

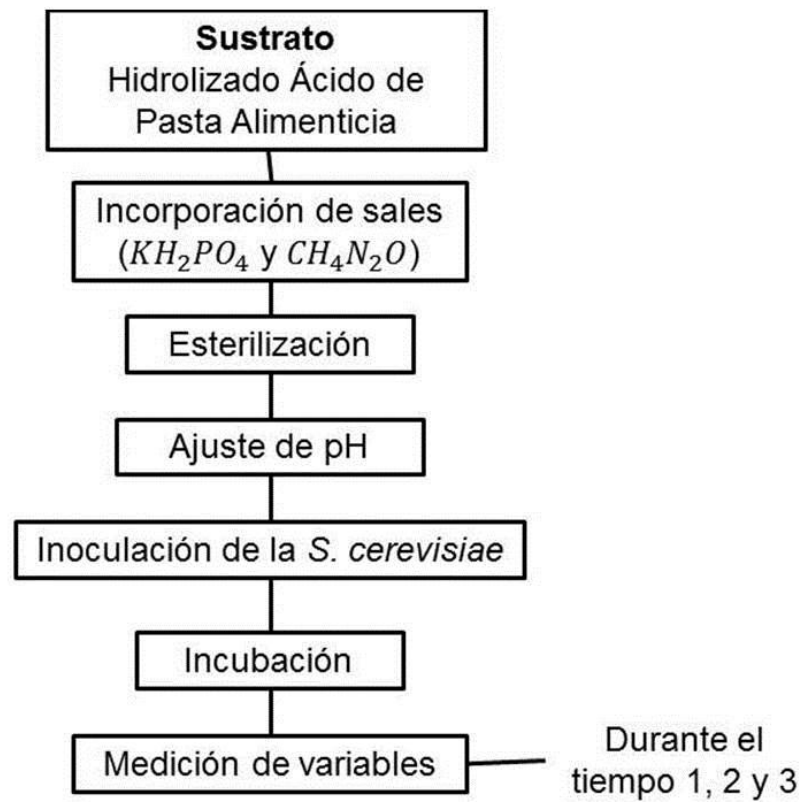


Figura 8. Esquema tecnológico de la producción de biomasa usando la pasta hidrolizada químicamente como sustrato por la *Saccharomyces cerevisiae*.

9.9.5 Valoración de proteínas por el método de Lowry. Fundamento Teórico

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico que valora cuantitativamente a las proteínas, la cual la intensidad de color es proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert – Beer.

Es decir, este método consta de dos etapas:

- **Primera Etapa**

Los iones Cu^{2+} , en un medio alcalino, donde se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. De modo que, estos complejos Cu^{2+} proteína tienen un color azul y a su vez provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. Finalmente el Cu^{2+} es mantenido en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

- **Segunda Etapa**

La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin – Ciocalteau, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas actuando en el cobre como catalizador. A su vez, el principal constituyente del reactivo mencionado es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

9.9.5.1 Determinación de proteína por método Lowry

Luego de la producción de biomasa se realizó los análisis físicos- químicos para cuantificar proteínas por el método Lowry.

Asimismo, después de recuperar la biomasa fue sometida a tratamiento que consistió en tomar 5 ml de la muestra y 5 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, se agitó y se llevó a baño de María a 100 °C por 5 minutos.

Una vez tratada la muestra, se tomó 1 ml de muestra, se añadió 5 ml del reactivo Lowry y se agitó, se dejó reposar por 10 minutos en la oscuridad, se añadió 0,5 del reactivo Folin se agitó nuevamente, luego se dejó reposar nuevamente en la oscuridad durante 30 minutos.

Finalmente, se hizo lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 740 nm de longitud de onda, se realizó curva patrón con albumina usando diferentes concentraciones.

9.9.6 Determinación de 3,5- dinitrosalicílico al sobrenadante obtenido del proceso de producción de biomasa

Se tomó muestra al sobrenadante de cada tratamiento para determinar azúcares reductores por el método de 3,5- dinitrosalicílico, ver ecuación 1.

9.9.7 Equipo de fermentación

Para el desarrollo del proceso de producción de biomasa se implementó 10 fiolas como bioreactores con tapones elaborados con gasas, se usó una incubadora orbital ya descrita anteriormente, del mismo modo, se le dio las condiciones óptimas a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

9.9.8 Determinación del tiempo del proceso de producción de biomasa

Para el estudio del comportamiento de la levadura en el sustrato se llevó a cabo tres repeticiones del proceso de producción de biomasa antes descrito, para cada repetición se elaboró una curva de crecimiento y se representó la variación de absorbancia en función del tiempo. La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda, se tomó muestras de 5 ml del medio durante periodos de tiempo establecidos. Zumbado y González (2006).

9.9.9 Preparación de tres tratamientos 1. Melaza, 2. Hidrólisis enzimática 3. Hidrolisis ácida (p/v) como sustrato para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para evidenciar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo, se preparó tres concentraciones: melaza, hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida (p/v). Se realizó una siembra para cada una de las concentraciones, en caldo y se sometió a incubación a 30 °C durante 24 horas. Se tomó muestras para monitorear la producción de biomasa en el tiempo inicial (0), tiempo (1) 18 horas, tiempo (2) 21 horas y tiempo (3) 24 horas, luego se hizo conteo de microorganismos en una cámara Neubauer. Se desarrolló metodología con modificaciones de Fajardo y Sarmiento (2007).

9.9.10 Medición de crecimiento microbiano en cámara de Neubauer para el recuento de levaduras

Este método consiste en la observación en un microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de células, la cual se usan portaobjetos especiales denominados Cámara Neubauer. Asimismo, su diseño se centra en contener una cantidad fija de suspensión celular líquida. Al mismo tiempo, posee un cuadro central de 1 mm de lado de 25 cuadritos y a su vez cada uno está dividido en 16 cuadros. Altamirano (2013).

Se realizaron mediciones en el tiempo inicial y tiempo final, donde se tomó 1 ml de muestra de cultivo y se procedió hacer una dilución adicionando 1 ml azul de metileno y 18 ml de agua destilada, y por último se agitó la muestra.

El cultivo fue cuantificado por medio de la cámara Neubauer con un microscopio óptico con aumento de 40 X, se hizo una relación para determinar el número de células/ml al igual que también se realizó mediciones de pH y °Brix durante el proceso de producción de biomasa. Los cálculos fueron tomados de la referencia ya mencionada.

9.9.11 Determinación de biomasa

Para determinar la biomasa, se aplicó la técnica de peso seco. Se tomó muestras durante el proceso de producción de biomasa una vez dadas las condiciones a la levadura para su crecimiento dentro de las 24 horas de incubación. Por otro lado, se tomaron tubos de eppendorf estéril se enumeraron, se llevaron a estufa a 94°C por 24 horas luego fueron pesados.

De la misma manera, se tomó 2 ml de muestra en tiempo 0, tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3 se centrifugo y se procedió hacer dos lavados con agua estéril completando los 2 ml y se llevó a centrifugado por 10 minutos a temperatura 4 °C. Una vez obtenido el producto ya centrifugado se llevó a estufa a 94 °C por un lapso de una hora, luego se sacó de la estufa y se dejó reposar en un desecador por 30 minutos y se procedió a pesar, luego se repite procedimiento por segunda vez.

Finalizado el tiempo de secado y pesados los 20 tubos de cada tiempo, se determinó el promedio del peso que contenían las células, asimismo se calculó diferencia de peso entre el promedio y se determinó las concentración de cada uno y se obtuvo una curva de peso seco de *Saccharomyces cerevisiae* que se trabajó durante el todo el proceso.

9.9.12 Análisis de la Varianza (ANOVA) a los tres tratamientos en la producción de biomasa.

El análisis de la varianza es contemplada como caso especial de la modelización econométrica, la cual, el conjunto de variables explicativas son variables ficticias y la variable dependiente es de tipo continuo. Por lo tanto, el análisis de la varianza se basa en la descomposición de la variación total y además en la comparación de la variación entre grupos y la variación intra grupos, y se tiene en cuenta sus correspondientes grados de libertad. Otero, Herrarte y Medina (2005).

Para la presentación e interpretación de resultados, donde se aplicó análisis estadístico, en la cual se realizó un análisis de varianza y se aplicó ANOVA para evaluar en los tres tratamientos realizados el efecto de la levadura durante el crecimiento celular obtenida en el proceso, se realizó gráficos, además se usó el Test de Tukey, la cual, se calculó la media, la desviación estándar, el coeficiente de varianza. Fajardo y Sarmiento (2007).

Es de gran importancia acotar, que se aplicó ANOVA para establecer cuál de las tres concentraciones que se implemento tuvo mejores resultados cuando se sometió a tratamiento durante el proceso de obtención de proteína unicelular de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Caracterización de la pasta alimenticia no comercial para identificar su composición nutricional

Tabla 8

Composición química de la pasta no comercial

Componentes	Pasta alimenticia no comercial (%)
Cenizas	0,975
Humedad	11,15
Grasas	1,82
Proteínas	11,86
Almidón	72,58

La composición química obtenida se muestra en la tabla 8. Se observó que el producto está compuesto principalmente por almidón, proteínas y con un porcentaje menor de minerales y grasas.

Cabe mencionar que, se obtuvo resultados de grasa, proteínas y de almidón de la caracterización del sustrato por debajo de los valores mostrados en la referencia Domínguez et al. (2011). En el caso del almidón se obtuvo 72,58% de proteína 11,86% y 1,82% de grasa y se comparó con el estudio ya expuesto que obtuvo un valor de almidón 79,96%, proteína 11,96%, grasa 2,28% la diferencia de resultados se debe posiblemente a las pérdidas de características del sustrato durante el proceso. Martínez (2010).

Sin embargo, la harina de trigo usada para producción de pasta posee almidón (63% - 72%), proteína (12%) y lípidos (2%) Rosicka-Kaczmarek et al. (2018). Es decir que, los valores obtenidos de la caracterización del sustrato demuestran que tienen las características adecuada para el desarrollo de la experiencia que se llevó a cabo.

Por lo tanto, al establecer una comparación de los resultados logrados con las referencias se observó que los resultados obtenidos del contenido de almidón permitieron que se

desarrollara el tratamiento para obtener azúcares reductores. Entonces, el alto contenido de almidón en la muestra hace de ella un potencial como sustrato para ser hidrolizada a glucosa.

10.2 Condiciones óptimas de hidrólisis de enzima alfa amilasa y pululanasa en la hidrólisis de almidón.

10.2.1 Determinación de la curva patrón de glucosa

Al realizar la técnica DNS después de cada hidrólisis; tratamiento enzimático e hidrólisis ácida se realizó una curva patrón de glucosa y se obtuvo la ecuación 2.

Ecuación 2:

$$Y = mx + b$$

$$Y = 0,3595 - 0,0451$$

$$R^2 = 0,995$$

Modelo matemático de la curva Patrón Glucosa.

10.3 Cinética de la alfa amilasa

Tabla 9
Comportamiento de la enzima alfa amilasa en función del tiempo, concentración, temperatura y pH usando almidón puro como sustrato.

Concentración, temperatura, pH y tiempo	Actividad enzimática de la alfa amilasa concentración de glucosa mg/l
3%, 70°C, pH 5, 1 hora	4,882
3%, 70°C, pH 5, 2 horas	4,872
3%, 70°C, pH 5, 4 horas	4,717

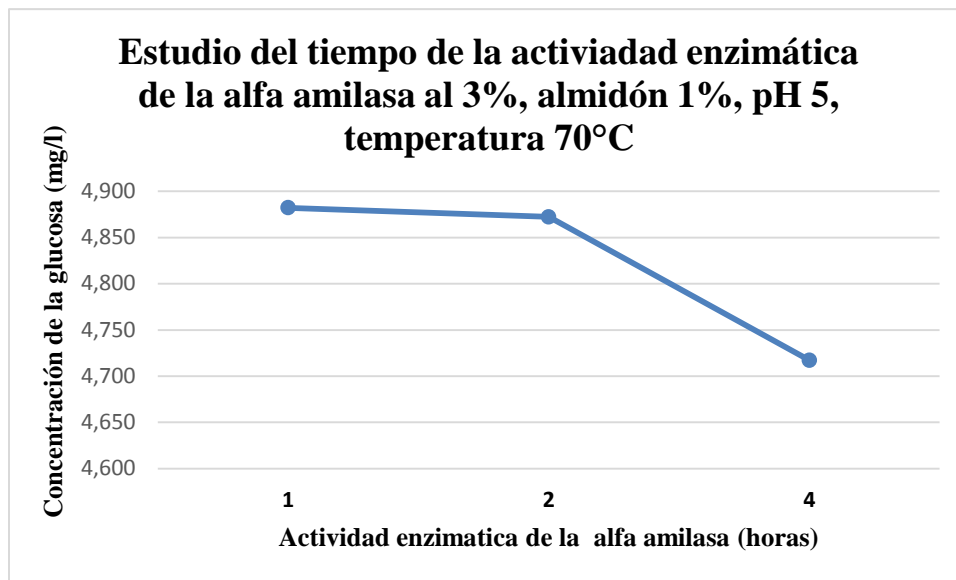


Figura 9. Medición de la actividad enzimática de la alfa amilasa en función del tiempo.

Para establecer las condiciones de actividad enzimática máxima se estudió por separadas ambas enzimas usando como sustrato almidón puro y se obtuvo condiciones óptimas de cada enzima: concentración, temperatura, pH y tiempo.

Para la enzima alfa amilasa, se obtuvo concentración 3 %, pH 5, temperatura 70 °C en 1 hora de actividad enzimática. Asimismo, los resultados obtenidos son parecidos a los resultados reportados por investigadores de referencia antes mencionada en la metodología, donde obtuvieron concentración de 1 %, pH 6, temperatura 70 °C.

10.4 Cinética de la pululanasa

Tabla 10

Comportamiento de la enzima pululanasa en función del tiempo, concentración, temperatura y pH usando almidón puro como sustrato.

Concentración, temperatura, pH y tiempo	Actividad enzimática de la pululanasa concentración de glucosa mg/l
2%, 50°C, pH 4, 1 hora	3,76
2%, 50°C, pH 4, 2 horas	3,88
2%, 50°C, pH 4, 4 horas	3,45

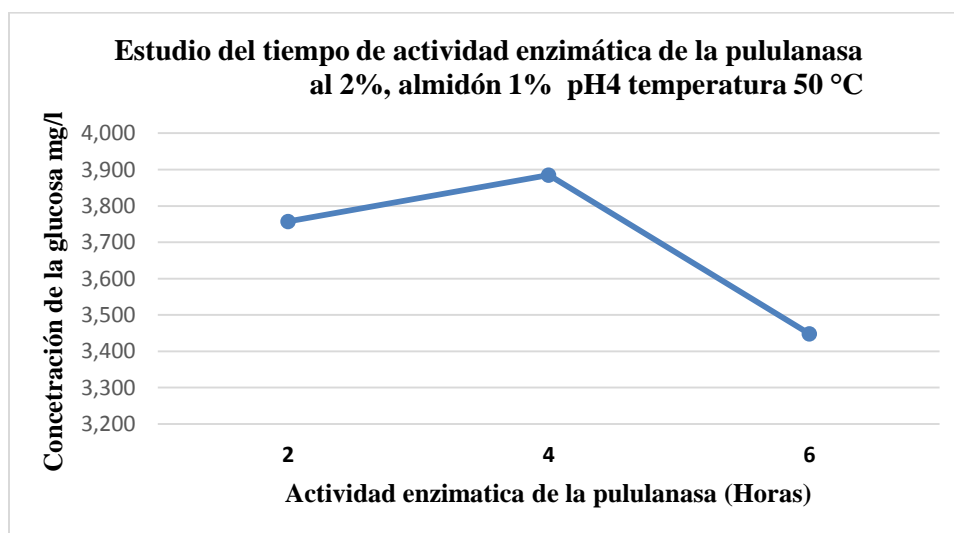


Figura 10. Medición de la actividad enzimática de la pululanasa en función del tiempo.

Por consiguiente, Como se refleja en la tabla 9 y figura 9, se obtuvo máxima actividad enzimática para la alfa amilasa en una hora mientras que, la pululanasa tuvo mayor actividad enzimática durante un periodo de dos horas (ver figura 10). Sin embargo, con la enzima pululanasa los resultados obtenidos pasadas una hora y dos horas no tuvieron diferencias significativas entre sí (Ver tabla 10), por lo que se decidió trabajar ambas enzimas en una hora cada una. Por otro lado, a las 4 horas de hidrólisis hubo un descenso con ambas enzimas indicando que había escasa actividad enzimática.

Hay que destacar que, la enzima alfa amilasa produjo mayores cantidades de azúcares reductores obteniendo un valor de 4,87 mg/l mientras que, con la enzima pululanasa se obtuvo un valor de 3,88 mg/l a las dos horas de hidrólisis. Posiblemente la menor cantidad de rompimiento de enlace y la baja producción durante la hidrólisis con la enzima pululanasa se deba a las impurezas que puedan estar presentes en la enzima y a la eficiencia de las enzimas utilizadas. Sreenath y Bemiller (1990).

Asimismo, estos investigadores reportaron que especialmente la liberación de glucosa depende de la concentración de la enzima alfa amilasa sola o combinada y el periodo de reacción es directamente proporcional al incremento de la concentración de glucosa.

10.5 Tratamiento enzimático empleando enzima alfa amilasa y la enzima pululanasa a la pasta alimenticia no comercial.

En el tratamiento enzimático al que fue sometido la pasta alimenticia, en donde se usó primero alfa amilasa, luego se inactivó, para incorporar pululanasa, se obtuvo como resultado 1,37 mg/l de azúcares reductores la cual, está por debajo a los logrados de manera independiente por cada enzima resultados ya expuesto anteriormente.

Por otro lado, este valor obtenido después del tratamiento enzimático de la pasta fue por debajo al que se generó en las pruebas realizadas con almidón puro hidrolizado enzimáticamente trabajado con las mismas condiciones de cada enzima planteado en el tratamiento de la pasta dando un valor de 5,08 mg/l de azúcares reductores, lo que lleva a inferir que hay presencia de elementos inhibidores en la pasta alimenticia que pudieron afectar la liberación de mayor cantidad de glucosa de la hidrólisis por estas enzimas.

No obstante, otra explicación que se le puede dar a los bajos resultados obtenidos de glucosa pueda deberse a que falto determinar la resistencia del almidón ya que puede afectar los factores del proceso de hidrólisis como son el tiempo, temperatura, pH y

concentración de la alfa amilasa; información que se tomó de referencia consultada. Wang, Yuan, Chen, Meng y Zhu (2015).

Estos autores reportaron que el tiempo de hidrólisis puede afectar la obtención de glucosa y el tiempo óptimo para la actividad enzimática de la alfa amilasa, tiempo óptimo de reacción enzimática en la que trabajaron fue de 40 min. En el tratamiento de la pasta solo se estudió condiciones de tiempo de periodo de 1, 2 y 4 horas siendo significativo el tiempo de hidrólisis como lo resaltaron los autores mencionados.

10.6 Hidrólisis química de la pasta alimenticia empleando ácido clorhídrico 6 N.

Una vez que se sometió la pasta alimenticia a hidrólisis química con una concentración de ácido de 30 ml de HCL 6 N durante 3 horas a 80°C para el rompimiento de los almidones se observó que, hubo un incremento de la concentración de azúcares reductores de 2,177 mg/l de glucosa.

Asimismo, investigadores de referencias consultadas reportaron que el tratamiento de la hidrólisis ácida que desarrollaron obtuvieron 0,14 g de azúcares reductores y a su vez, trabajaron a una temperatura de 75 °C por 40 minutos y al dejar correr el tiempo hasta 8 horas observaron el incremento de los azúcares fermentables. Quintero et al. (2015).

La pasta alimenticia sometida a tratamiento químico obtuvo una concentración de azúcares reductores mayor a la tratada enzimáticamente. Es por eso, que la referencia mencionada demostró que el aumento del tiempo de acción de hidrólisis favorece el rompimiento de enlace en el almidón.

La combinación de elevada temperatura (75 a 95°C) y elevada concentración de ácido (2% a 3%) transforman los azúcares en frutales siendo estos inhibidores de la actividad microbiana. Gualtieri y Sánchez (2003).

10.7 Evaluación de los tres tratamientos: 1. Hidrólisis enzimática, 2. Hidrólisis ácida y 3. Melaza como sustrato en la producción de biomasa por la *Saccharomyces cerevisiae*.

10.7.1 Comportamiento del pH

Se realizó monitoreo de los cambios producidos en los caldos de producción de biomasa de los tratamientos 1, 2 y 3 durante el proceso por medio de la medición del pH.

Entonces se puede observar que, en las gráficas 11, 12 y 13 se percibió la disminución de pH en los medios desarrollados. Los tres tratamientos presentaron valores de pH dentro de las condiciones específicas establecidas para el crecimiento de la levadura de un pH comprendido 4,0 y 5,0; información citada por Aguilar et al. (2015).

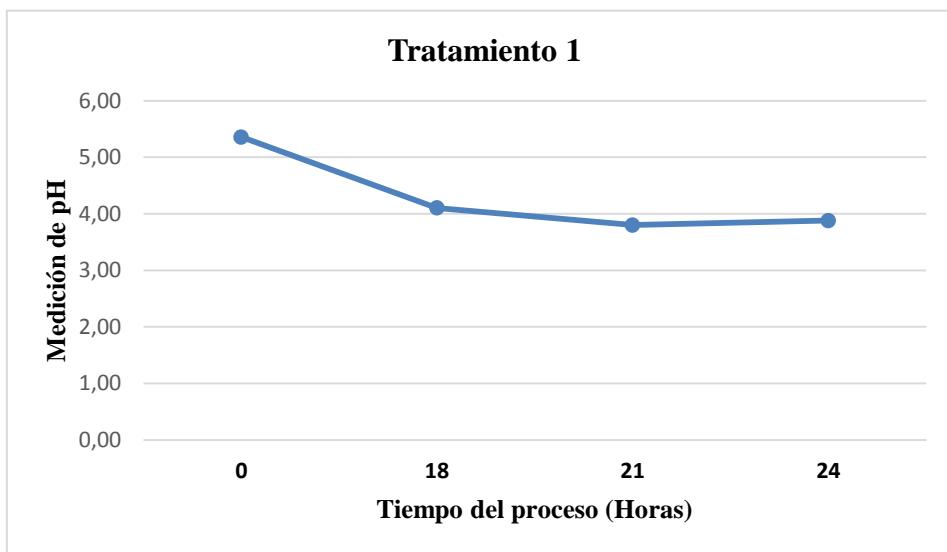


Figura 11. Comportamiento del pH durante la producción de biomasa usando como sustrato la melaza.

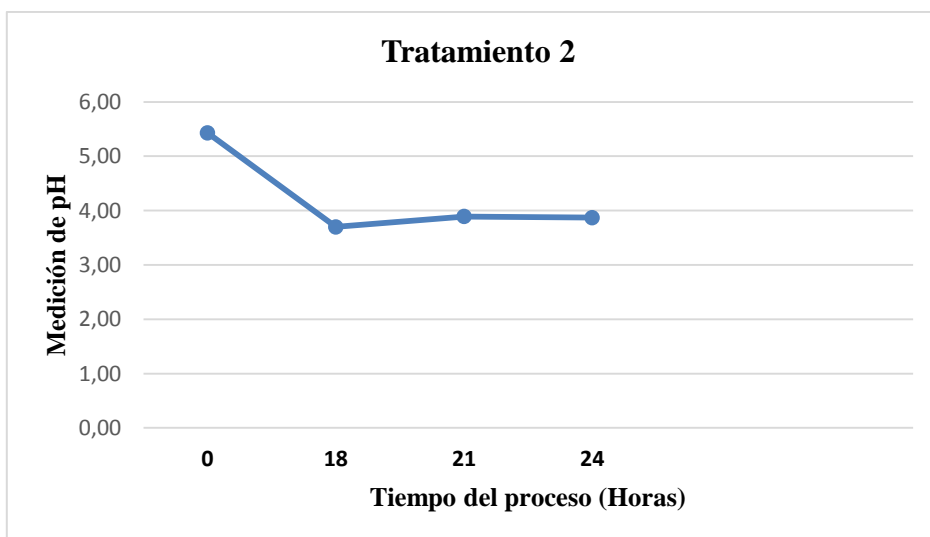


Figura 12. Comportamiento del pH durante la producción de biomasa usando como sustrato la pasta tratada enzimáticamente.

Si bien es cierto, se observó que el pH descendió durante la producción de biomasa durante las 24 horas de 5,36 a 3,88 representando una disminución de 27,61% ver figura 11 en el tratamiento 1, y en la figura 12 en el tratamiento 2 la cual, se puede visualizar una disminución del pH 5,42 a 3,87, representando una caída de 28,59%.

Por consiguiente, los resultados obtenidos son atribuidos a la producción de ácidos orgánicos generados durante el metabolismo de la levadura. Por lo tanto, se hizo una comparación de caída de pH de los valores obtenidos de la referencia consultada donde reportaron una caída de pH de 4,5 a 2,2 y represento un 51,11%. Domínguez et al (2011).

Ahora bien, se percibió de manera significativa el descenso del pH en el medio de melaza suplementada y en la pasta tratada enzimáticamente donde ambos medios de cultivo mantuvieron un pH relativamente estable. No obstante, en el sustrato tratado con hidrólisis enzimática se pudo observar mayor estabilidad de pH en comparación con el de la melaza suplementada (ver figura 11 y 12), esto puede deberse a que el sustrato hidrolizado contenía un material estabilizador de pH (buffer). Información sacada de los datos y resultados reportados por Aguilar et al. (2015).

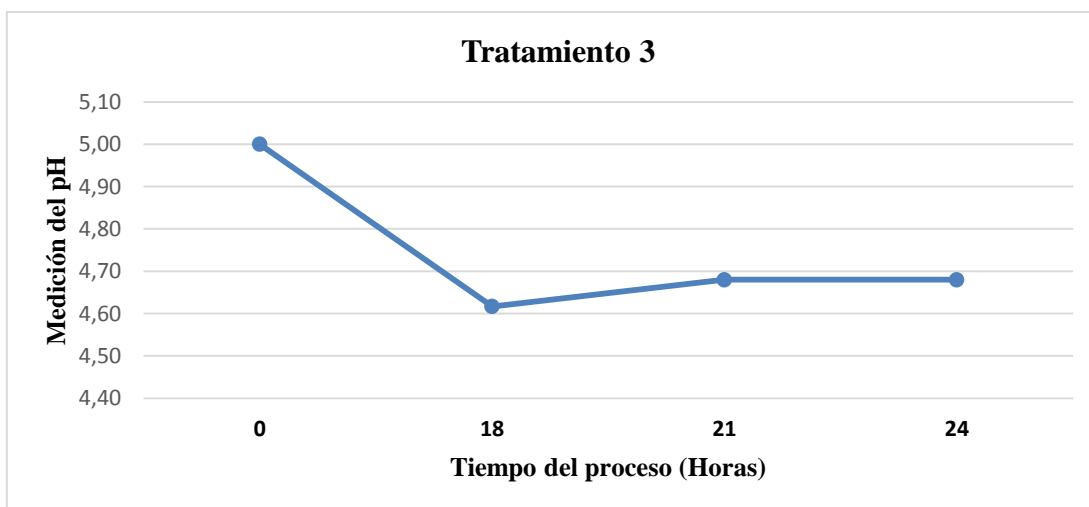


Figura 13. Comportamiento del pH durante la producción de biomasa usando como sustrato la pasta tratada químicamente.

Con la aplicación del tratamiento 3 se puede apreciar que la variación del pH no disminuye tanto de 5,00 a 4,68, solo disminuyó un 6,8% (ver figura 13) en comparación con el tratamiento 1 y 2 expresado gráficamente en figura 11 y 12. Y esto puede ser producto de la hidrólisis ácida en la que se forman ciertos compuestos y se clasifican en tres grupos derivados del furano y furaldehidos como el fufural y el 5-hidroximetilfurfural el cual, pueden ser inhibidores durante el metabolismo de la levadura como reporta Quintero et al. (2005).

10.8 Determinación de proteína por método lowry

10.8.1 Determinación de la curva patrón de albumina

Se realizó curva patrón con albumina usando diferentes concentraciones, se obtuvo como resultado la siguiente ecuación.

Ecuación 3:

$$Y = mx + b$$

$$Y = 0,5159 + 0,0017$$

$$R^2 = 0,9694$$

Curva Patrón albumina de Bovino

Tabla 11

Resultados obtenidos de la determinación de proteína por Lowry aplicado a los tres tratamientos desarrollados.

Biomasa	Proteína %
Sustrato a base melaza	21,68
Sustrato a base pasta tratada enzimáticamente	22,42
Sustrato a base pasta tratada con hidrólisis ácida	25,61

Basado en los resultados obtenidos, en la producción de proteínas en las tres distintas experiencias, se logró una producción de 21,68% de proteínas en el proceso de obtención unicelular empleando como sustrato la melaza (tratamiento1); del mismo modo, se consiguió generar 22,42 % de proteínas usando el sustrato pasta con tratamiento enzimático (tratamiento2) y finalmente se produjo un total de 25,61 % de proteínas de la pasta sometida a hidrólisis ácida (tratamiento 3).

De estas evidencias, se observó que en el tratamiento 3, sustrato tratado con hidrólisis química, obtuvo un mayor porcentaje de proteínas comparado con los tratamientos 1 y 2,

esto puede ser producto de la mayor disponibilidad de moléculas de glucosa para ser metabolizada por las levaduras, a pesar que la diferencias entre los tres no es muy grande.

Por otro lado, se pudo evidenciar que se obtuvo una productividad de biomasa baja, según Domínguez et al. (2011) que obtuvieron un enriquecimiento de 68,93 % proteico del producto respecto al sustrato original, comparación que se hace por ser un sustrato con características similares al de este estudio, donde se obtuvo un 22,42 % con tratamiento enzimático y con tratamiento químico se obtuvo 25,61 % (ver Tabla 11).

Asimismo, como lo reportaron Zumbado y Esquivel (2006), dicha productividad baja puede estar relacionada con la concentración inicial de azúcares en el medio de crecimiento. Además, ellos demostraron en su estudio que luego de la hidrólisis, la azúcar presente en el medio era de 20 g/l de glucosa e indicaron que este nivel de azúcar, bien sea en condiciones aeróbicas puede causar que las levaduras de la especie *S. cerevisiae* se desarrollen por la vía de la fermentación más que la de la respiración, por causa del efecto Crabtree.

Al mismo tiempo, el efecto Crabtree causa la disminución drástica de la generación de biomasa, debido a que la utilización del sustrato se desvía hacia la producción de etanol, lo que hace que la formación de biomasa disminuya.

10.9 Crecimiento microbiano

Se realizó el conteo en el cuadro central (25 cuadros) tomando como referencia solo 5 cuadros usando la Ecuación 4 para los calcular la concentración celular.

Tabla 12
Concentración celular tomada al inicio y final del proceso de producción de biomasa obtenido de los tres tratamientos aplicados.

Sustrato	Concentración celular (cél/ml)	Concentración celular (cél/ml)
	Tiempo 0	Tiempo 24 horas
Melaza	2×10^6	$6,31 \times 10^8$
Pasta tratada enzimáticamente	$1,39 \times 10^8$	$1,46 \times 10^8$
Pasta tratada hidrólisis ácida	$21,975 \times 10^7$	$3,46 \times 10^8$

El mayor crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo en el medio con melaza $6,31 \times 10^8$ células/ml con una concentración de proteína de 21,68% (ver tabla 11 y 12) comparado con el tratamiento (2) $1,46 \times 10^8$ células/ml con una concentración proteica de 22,42% y con el tratamiento (3) $3,46 \times 10^8$ células/ml con un porcentaje proteico de 25,61% pasadas las 24 horas.

De acuerdo, a Gualtieri et al. (2007). Reportaron que se obtuvo un mayor porcentaje de proteína usando melaza como sustrato, muy diferente a los resultados logrados en el presente estudio que se obtuvo mayor porcentaje de proteína cuando se trabajó con la pasta tratada con hidrólisis ácida y seguidamente de la pasta tratada enzimáticamente, la cual significa que, la levadura tuvo un mayor crecimiento celular cuando se usó el sustrato hidrolizado con ácido clorhídrico 6 N.

10.10 Análisis de Varianza

Tabla 13

Análisis de la varianza de la medición de la densidad óptica para los tres tratamientos usados para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

F. V.	SC	gL	CM	F	p - valor
Modelo	30,14	2	15,07	1065,61	< 0,0001
Tratamientos	30,14	2	15,07	1065,61	< 0,0001
Error	0,38	27	0,01		
Total	30,52	29			

Tabla 14

Evaluación de los tres tratamientos Test: Tukey

Tratamientos	Medidas	n	E.E	
3	0,66	10	0,04	A
1	0,67	10	0,04	A
2	2,79	10	0,04	B

Nota: Media con una letra Error: 0,0141 gL: 27. Común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) Test: Tukey Alfa= 0,05 DMS= 0,13186

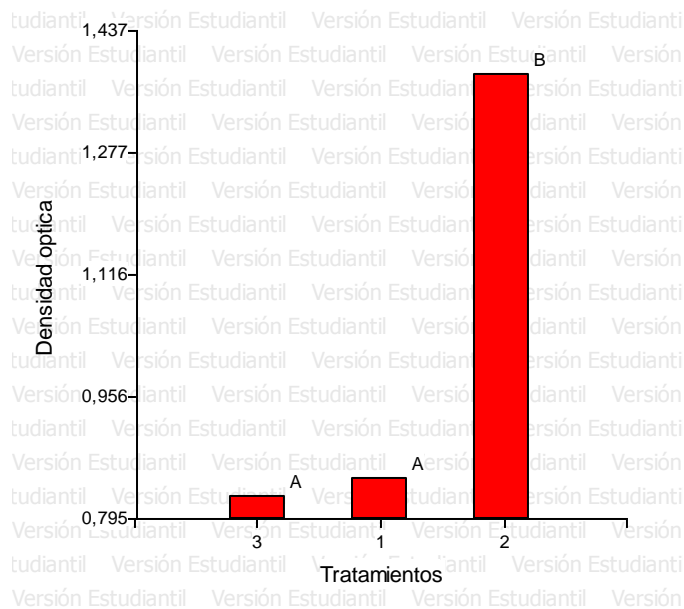


Figura 14. Análisis de varianza de la medición de la densidad óptica en el tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento 1 y 3 con letras A (Ver tabla 14) no tienen diferencias significativas (son iguales) ($p < 0.05$) como lo muestra la tabla 20 prueba de Tukey y la figura 14, sin embargo, el tratamiento 2 tiene diferencias significativas (es diferente) ($p > 0.05$) en comparación con el tratamiento 1 y 3. Asimismo, la media del tratamiento 2 de 2,79 mostró mayor producción de biomasa (densidad óptica) en comparación con los otros tratamientos evaluados.

XI. CONCLUSIONES

- El alto contenido de almidón presente en la pasta es propicio para la producción de azúcares metabolizables.
- Las condiciones óptimas alcanzadas por las enzimas permitieron alcanzar un 89,04 % de incremento proteico con respecto a la pasta como sustrato nutritivo.
- Con los tres tratamientos se logró aumentar en un cien por ciento el contenido de proteína, sin embargo el mejor tratamiento fue el enzimático y puede ser considerado como propuesta para la producción de proteína.

XII. RECOMENDACIONES

- Aumentar los rangos de evaluación en la producción de biomasa para definir condiciones óptimas más precisa de densidad óptica, peso seco, cámara Neubauer, DNS, pH, °Brix.
- Realizar el proceso de hidrólisis bajo tiempos más prolongados con el fin de obtener rendimientos mayores empleando concentraciones de enzimas distintas a las usadas.
- Realizar una cromatografía para conocer los componentes que se hidrolizaron, para identificar los nutrientes que son necesarios para la levadura en la producción de biomasa de la pasta hidrolizada.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, J. Espinoza, M. Cabanillas, J. Ávila, I. García, A. Julca, J. Tacanga, D. Zúta, I. y Linares, G. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Revista Agroindustrial Science* [Revista en línea]. Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.
2. Alezones G., J. M. y Ortiz, A. (2017). Caracterización histórica del cultivo de soya en Venezuela. *Revista Alcance* [Revista en línea], 73, Yaracuy, Venezuela.
3. Altamirano Cahuancama, C. A. (2013). *Optimización de un método para la producción de biomasa de Saccharomyces cerevisiae empleada en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde a un nivel piloto*. Tesis de Grado no publicada. Universidad de Mayor de San Marcos, Facultad de Química, Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial, Perú.
4. Buitrago Estrada, J. C. Tenjo Camacho, D. G. (2007). *Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Grado no publicado. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.
5. Cardozo Guzmán, M. C. y Moreno Cardozo, J. H. (2012). *Diseño y optimización de un medio de cultivo a base de melaza de caña para la producción de biomasa a partir de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Grado no publicado. Pontificia universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.
6. Carrasco Adrian, P. J. (2009). *Evaluación de calidad de las pastas alimenticias de sémola durum*. Trabajo de grado de maestría no publicado, Universidad del Zulia, Facultad de Ingeniería. Maracaibo, Venezuela.

7. Chacón Villalobos, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Revista Agronomía Mesoamericana*. [Revista en línea], 15(1), Costa Rica.
8. COVENIN. (1994). Normas venezolanas 283. Pastas Alimenticias. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela.
9. Cruz Ruiz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrolisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano*. Trabajo de grado de maestría no publicado Universidad Nacional de Colombia Facultad de minas, Escuela de Procesos y energía Medellín, Colombia.
10. Daramola, M.O. y Zampraka, L. (2007). Experimental study of the production of biomass by *Sacharomyces cerevisiae* in a fed batch fermentor. *Revista African Journal of Biotechnology* [Revista en línea], 7(8), South África.
11. Díaz, M. Semprún, A. y Gualtieri, M. (2003). Producción de proteína unicelular a partir de desechos de vinaza. *Revista de la Facultad de Farmacia* [Revista en línea], 45(2).
12. Domínguez, G. Bertsch, A. Mazzani, C. Luzón, O. y Vasco de Basilio. (2011). Obtención de un aditivo microbiano producto de la fermentación de los desechos del pastificio por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* y su evaluación nutricional en pollo de engorde. *Revista Científica, FCV-LUZ* [Revista en línea], 21(1). Venezuela.
13. Espita Rocha, L. C. (2009). *Determinación de la concentración de la alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada a partir almidón de cebada empleando Saccharomyces cerevisiae* [versión completa en línea], Trabajo de grado de Microbiología Industrial no publicado, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C
14. Fajardo Castillo, E. E. y Sarmiento Forero, S. C. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. [versión completa en

línea], Trabajo de grado de Microbiología Industrial no publicado, Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de ciencia, Carrera de Microbiología Industrial, Bogotá, D.C.

15. Fatemeh, S. Reihani, S. y Khosravi-Darani, K. (2018). Influencing factors on single- cell protein production by submerged fermentation: A review. *Revista Electronic Journal of Biotechnology* [Revista en línea], 37, Republic of Iran.
16. Ferrer, J. R. Davalillo, Y. Chandler, C. Páez, G. Mármol, Z. y Ramones, E. (2004). Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo). *Revista Arch. Latinoam. Prod. Anim* [Revista en línea], 12(2), Venezuela.
17. Gómez, E. Estrada, A. Bacilio J. Castañeda, A. Alvarado, L. Valverde L. Wong, W. Santa Cruz, M. y Linares G. (2015). Evaluación de harina de soya como fuente primaria en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Agroindustrial Science* [Revista en línea], 5(1), Perú.
18. Gonzáles Tello, P. Camacho Rubio, F. Robles Medina, A. y Morales Villena, L. J. (1990). Hidrólisis de harina de trigo con α - amilasa de *A. oryzae*, *Revista Agroquím. Tecnol. Aliment* [Revista en línea], 30(1), Departamento de ingeniería. Facultad de ciencias. Granada.
19. Gualtieri Y, M. y Sánchez Crispín, J. A. (2003). Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz (*Zea mays*). *Revista de la Facultad de Farmacia* [Revista en línea], 45(2).
20. Gualtieri A., M. J. Villalta R., C. Díaz T., L. Medina, G. Lapenna, E. y Rodón, M. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *coffea arabica*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* [Revista en línea], 38(2). Caracas.

21. Guoa, P. Yu, J. Wang, Shujun y Wang, Shuo (2017). Effect of particle size and water content during cooking on the physicochemical properties and in vitro starch digestibility of milled durum wheat grains. Trabajo no publicado. Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, China.
22. Gutiérrez Ramírez, L. A. y Gómez Rave, A. de J. (2008). Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en el bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación* [Revista en línea], 5(1).
23. Hernández-Mora, J. A. y Acevedo-Paéz, J. C. (2013). Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glicerina, subproducto de biodiesel. *Revista Ingeniería Solidaria* [Revista en línea], 9(16). Grupo de Investigación Eureka, Cúcuta.
24. López Rivas, J. J. y Prado Arroliga, J. L. (2015). *Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto*, [versión completa en línea], Trabajo de grado en química Industrial. Departamento de Química, UNAN, Universidad Autónoma de Nicaragua.
25. Martínez, C. S. (2010). *Utilización de pastas como alimentos funcionales* [versión completa en línea]. Trabajo de Tesis Doctoral no publicado, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas.
26. Martínez Gallegos, J. F. (2005). *Utilización de α -Amilasas en la formulación de detergentes industriales* [versión completa en línea], Tesis Doctoral no publicado, Universidad de Granada, Facultad de ciencias. Departamento de Ingeniería Química.
27. Mera, I. y Carrera Castaño, J. (2005). Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot Sculenta*. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*. [Revista en línea], 3(1).
28. Otero, J. V. Sánchez, A. H. y Medina Moral, E. (2005). Análisis de la Varianza (ANOVA). Datos no publicados.

29. Peña, A. Molina, D. y Torres, R. (2009). Hidrólisis de Almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de Alfa amilasa. *Memoria del IV Simposio de Química Aplicada –SIQUIA*. Universidad Industrial de Santander, Ciudad Universitaria, Colombia.
30. Quintero Mora, L. P. Martínez Castilla, Y. Velasco Mendoza, J. A. Arévalo Rodríguez, A. Muñoz, Y. A. y Urbina Suarez, N. U. (2015). Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. *Bucaramanga* [Revista en línea], 28(1), Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS), Cúcuta, Colombia.
31. Reyna M., L. Robles, R. Reyes P., M. Mendoza R., Y. y Romero D. (2004). Hidrólisis Enzimática del Almidón. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* [Revista en línea], 7(1), Facultad de Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
32. Rosicka-Kaczmarek, J. Kwasniewska-Karolak, I. Nebesny, E. y Komisarczyk, A. (2018). The Functionality of Wheat Starch, *Lodz University of Technology, Lodz, Poland*.
33. Sestili, F. Sparla, F. Botticella, E. Janni, M. D' Ovidio, R. Falini, G. Marri, L. Cuesta Seijo, J. Moscatello, S. Battistelli, A. Trost, P. y Lafiandra, D. (2016). The down – regulation of genes encoding Isoamylasa 1 alters the starch composition of the durum wheat grain. *Revista Plant Science* [Revista en línea], 252, Italy.
34. Sreenath, H. K. y Bemiller, J. (1990). Effect of pullulanase and α - Amylase on hidrolisis of Waxy Corn Starch, [Revista en línea], 42, Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/247961163> IN (U.S.A).
35. Sosa S. (2015). *Caracterización del contenido de almidón de residuos de pan para la obtención de jarabes de glucosa* [versión completa en línea], Trabajo de grado de Ingeniería Alimentaria no publicado, Universidad Politécnica de Catalunya.

36. Suárez-Machín, C. Garrido-Carralero, N. A. Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA sobre los derivados de la caña* [Revista en línea], 50(1), La Habana, Cuba.
37. Wang, W. Yuan, H. Chen, D. Meng, S. y Zhu X. (2015). Preparation of resistant starch by dual modified method from Indica rice starch. *Current topic in nutraceutical research* [Revista en línea], 13(4), Republic of China.
38. Wang, X. Nie, Y. Xu, Y. (2019). Industrially produced pullulanases with thermostability: discovery, engineering, and heterologous expression. Trabajo no publicado, Bioresource Technology. China.
39. Zumbado Rivera, W. (2005). *Selección de una especie de levadura para la producción de proteína unicelular utilizando como sustrato el suero residual del proceso de elaboración de queso blanco tipo Turrialba*. [versión completa en línea], Trabajo de grado en tecnología de los alimentos. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Escuela de Tecnología de Alimentos.
40. Zumbado, W. Esquivel, P. y González, E. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: Crecimiento en suero de queso. *Agronomía Mesoamericana*. [Revista en línea], 17(2), Universidad de Costa Rica.