

**EVALUACION DEL EFECTO DE TERMOLISIS Y PLASMOLISIS COMO
MECANISMOS PARA LA OBTENCION DE N₂ TOTAL APARTIR DE LEVADURA
RECICLADA DE LA FERMENTACION EN INCAUCA S.A.S.**

Presentado por:

LAURA CAROLINA CASTELLANOS PORTILLO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2017

**EVALUACION DEL EFECTO DE TERMOLISIS Y PLASMOLISIS COMO
MECANISMOS PARA LA OBTENCION DE N₂ TOTAL APARTIR DE LEVADURA
RECICLADA DE LA FERMENTACION EN INCAUCA S.A.S.**

Presentador por:

LAURA CAROLINA CASTELLANOS PORTILLO

Trabajo de Pasantía

Presentado como requisito para optar por el título de MICROBIÓLOGA.

Tutor Laboral:

JOHANNA MORENO CASTELLANOS

Coordinadora-Microbióloga Destilería INCAUCA S.A.S, ORTIGAL CAUCA.

Tutor Académico

Prof. M.Sc., Ph.D. FRANCISCO RODRÍGUEZ RINCÓN,
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2017

Nota de aceptación

Firma Jurado 1

Firma Jurado 2.

Pamplona, 12 Junio del 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi jefe inmediata la Microbióloga Johanna Moreno Castellanos, por sus enseñanzas, apoyo, comprensión y dedicación a lo largo de todo el proceso, por brindarme la oportunidad de hacer posible la ejecución de este proyecto y enriquecer mi aprendizaje durante estos seis meses, a mis compañeros y personal técnico del laboratorio de microbiología de Destilería INCAUCA S.A.S por su colaboración y calidad humana. Finalmente, a mi tutor académico, Prof. M.Sc., Ph.D. Francisco Rodríguez Rincón por su acompañamiento y valioso aporte durante mi experiencia de pasantía.

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana, que son un modelo para mí.
Gracias por su apoyo incondicional y sus deseos inquebrantables por mi
superación personal y alcance de mis metas*

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 GENERAL.....	14
2.2 ESPECIFICOS.....	14
3. JUSTIFICACION	15
4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4.1 FORMULACION DEL PROBLEMA	16
5. MARCO TEORICO	17
5.1. Características celulares de la levadura.....	17
5.2 El nitrógeno y el desarrollo de la fermentación.....	19
5.3 Hidrolizados de levadura	20
5.5 Evaluación de la eficiencia de los métodos de ruptura celular.	21
5.6 Proceso de obtención de alcohol carburante en la Destilería INCAUCA S.A.S.....	22
5.7 ANTECEDENTES.....	27
6. METODOLOGIA.....	29
6.1 Obtención de materias primas	29
6.2 Proceso experimental	30
6.3 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos complementarios	35
7. Actividades Complementarias	37
8. Análisis Estadístico	38
9. PLAN DE TRABAJO Y CRONOGRAMA DE EJECUCION DEL PROYECTO	39
10. RESULTADOS.....	41
11. ANALISIS DE RESULTADOS.....	50
12. CONCLUSIONES	54
13. RECOMENDACIONES	55
14. GLOSARIO	56
15. BIBLIOGRAFÍA	57

INDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

TN	Nitrógeno total
FAN	Nitrógeno Amino Libre.
DAP	Fosfato diamónico
mL	Mililitros
Lt	Litros
Mg/L	Miligramos/ Litros
R- 301	Reactor 301
R-305	Reactor 305
S- 331	Sedimentador 331
CH₂O	Formaldehído
NaOH	Hidróxido de Sodio
N	Normalidad
W/V	Peso/Volumen
T	Termólisis
P	Plasmólisis
T1	Primera réplica de termólisis
T2	Segunda réplica de termólisis
P1	Primera réplica de plasmólisis
P2	Segunda réplica de plasmólisis
H₀	Hipótesis nula
H_a	Hipótesis alternativa
MLH	Millones de levadura hidrolizada
% R	Porcentaje de rendimiento de levadura hidrolizada en términos de conteo
NFA	Nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de formulación de los biopreparados según el método de hidrolisis empleado con R-305.....	31
Tabla 2. Parámetros de formulación de los biopreparados según el método de hidrolisis empleado con S-331	33
Tabla 3 . Cronograma de actividades para la ejecución del presente trabajo.	39
Tabla 4. Ensayo por termólisis en tanque R-301 con levadura del R-305.....	41
Tabla 5 . Ensayo por plasmólisis en tanque R-301 con levadura del R-305.....	41
Tabla 6. Ensayo por termólisis en tanque R-301 con crema del S-331	42
Tabla 7. Ensayo por plasmólisis en tanque R-301 con crema del S-331	42
Tabla 8 . Ensayo final por termólisis en tanque R-301 con crema del S-331	43
Tabla 9. Réplica del ensayo final por termólisis en tanque R-301 con crema del S-331 ..	43
Tabla 10. Ensayo final por plasmólisis en tanque R-301 con crema del S-331	44
Tabla 11. Réplica del ensayo final por plasmólisis en tanque R-301 con crema del S-331	44
Tabla 12 . Tabulación de porcentajes de rendimientos de levadura hidrolizada obtenidos en cada etapa según su método de disrupción celular.....	45
Tabla 13. Porcentajes de FAN para cada método de hidrolisis de la etapa 3.	45
Tabla 14. Resumen Estadístico.....	46
Tabla 15 . Incremento porcentual en término de nitrógeno total	47
Tabla 16. Verificación de Varianza.....	48
Tabla 17 . Análisis de ANOVA.....	48
Tabla 18 . Pruebas de Múltiple Rangos.....	48
Tabla 19 . Contraste múltiple de muestras.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del sistema de fermentación de INCAUCA S.A.S.....	23
Figura 2. Diagrama de procesos de INCAUCA S.A.S.....	26
Figura 3. Modelo del reactor R-301 con los dos tratamientos de hidrolisis.....	30
Figura 4. Comparación del porcentaje de rendimiento de la levadura hidrolizada (%R) de los mecanismos de hidrolisis evaluados durante la metodología experimental	45
Figura 5. Comparación del porcentaje de FAN según el método de disrupción celular.....	46
Figura 6. Gráfico de dispersión del incremento en términos de Nitrógeno.	47
Figura 7. Gráfico de Fisher LSD.	49

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Planteamiento básico de la etapa 1 con levadura R-305.....	32
Diagrama 2. Planteamiento básico de la etapa 2 con la levadura reciclada.....	33
Diagrama 3. Planteamiento básico de la etapa 3 con la levadura reciclada.....	34

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recuentos fotográficos de la levadura del R-305 antes y luego de la hidrólisis.	59
Anexo 2. Recuentos fotográficos de la levadura del S-331 antes y luego de la hidrólisis.	59

1. INTRODUCCION

En la producción de alcohol carburante, las levaduras como todo microorganismo, tienen requerimientos nutricionales específicos que deben ser satisfechos adecuadamente para lograr la optimización del proceso (Otero & Cabello, 2007).

La mezcla de miel de caña de azúcar y agua es un buen medio de cultivo para las levaduras, la composición de este debe satisfacer todos los requerimientos nutricionales de estos microorganismos y procurar que su metabolismo trabaje en buena forma. Los azúcares presentes en la mezcla, fuente de energía para las levaduras, se presentan en abundancia para de estas mismas, pero no todos los nutrientes están siempre en tal condición, pues existen también otros como el nitrógeno que en ocasiones es deficiente produciendo una carencia que afectará directamente el buen desarrollo y viabilidad de la población de levaduras. La adición de nitrógeno a los reactores con el fin de corregir déficits, es hoy común en muchas industrias alrededor del mundo. Los beneficios de esta práctica están relacionados directamente a una disminución de los problemas de fermentaciones lentas o paralizaciones de estas y la calidad del vino obtenido (Gonzalez Rojas, 2000).

La necesidad de agregar nitrógeno al mosto dependerá de la cantidad de compuestos nitrogenados fácilmente aprovechables por las levaduras que se encuentren naturalmente presentes en el mosto a fermentar, por esta razón, la propagación de la levadura necesita de la suplementación adecuada de aire y componentes esenciales como N_2 y Fosforo, para lograr una producción óptima de biomasa. La mayoría de las levaduras son capaces de asimilar fuentes de nitrógeno simples (orgánico e inorgánico), para biosintetizar aminoácidos y proteínas. Las fuentes de nitrógeno más comúnmente utilizadas son DAP, amonio, urea y aminoácidos, aunque se pueden emplear otras como poliaminas, ácidos nucleicos y vitaminas (Serrano P. , Brizuela, Tejeda, Rodríguez, Iglesias, & Legrá, 2005)

El requerimiento de nitrógeno de muchos microorganismos tiene como requisito que éste sea de carácter orgánico, siendo éstos más costosos y de menor disponibilidad que los de origen inorgánico. Las fuentes de nitrógeno orgánico más empleadas para el cultivo microbiano son los extractos de levadura. La utilización de subproductos obtenidos a partir de las mismas levaduras suele ser reutilizadas para la formulación de medios de cultivo y es de gran aceptación, debido a su composición aminoacídica, siendo uno de los procesos más utilizados para liberar

esos aminoácidos es la hidrólisis o disrupción celular (Serrano P. , Brizuela, Tejeda, Rodríguez, Iglesias, & Legrá, 2005).

En las industrias alcohólicas donde usan levadura para cumplir funciones de fermentación suelen tener una descarga de exceso de este microorganismo lo cual requiere una atención especial. La levadura que se produce durante este proceso de fermentación sólo se reutiliza parcialmente para el posterior lanzamiento de nuevos ciclos fermentativos. Debido a que el mosto ya fermentado que contiene una población celular en promedio de 140 millones de levaduras vivas por mililitro pasa en su totalidad por un sedimentador, donde se extrae solo el 6 % de la levadura que se recircula cada hora. Sin embargo la residencia de este sedimentador es de 2.5 horas por lo tanto siempre existe un exceso de levadura que podría ser aprovechado para otros fines dado su valor nutricional bastante alto después de sufrir procesos de autólisis u otra clase de disrupción celular que generalmente se utiliza para la alimentación animal (Gonzalez Rojas, 2000).

Por esta razón el uso de hidrolizados de levadura reciclada como fuente de nitrógeno en procesos fermentativos en las industrias productoras de alcohol, aun no es objeto de estudio en la actualidad, pero si genera gran interés para futuros desarrollos. Por consiguiente la utilización de estos residuos industriales resulta siempre una buena alternativa, ya que con su tratamiento se evita que contaminen el medio ambiente, y así pasa de ser un desecho con valor negativo, a una materia prima, cuyo empleo resulta siempre económicamente ventajoso.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Evaluar por medio de termólisis y plasmólisis, la hidrolisis de levadura residual GRXII para obtener extracto líquido con un alto grado de nitrógeno orgánico con el fin de reemplazar la dosificación de urea en el proceso fermentativo en la Destilería de INCAUCA S.A.S.

2.2 ESPECIFICOS

- ❖ Cuantificar el rendimiento de levadura hidrolizada por medio de conteo celular.
- ❖ Determinar el incremento de nitrógeno disponible luego de una hidrólisis.
- ❖ Definir qué mecanismo de hidrolisis utilizado en la metodología es óptimo para obtener mayor cantidad de nitrógeno total.

3. JUSTIFICACION

Este uso industrial de levadura adaptada a procesos de fermentación del género *Saccharomyces* es de interés práctico pues cada año se desperdician cantidades cercanas o mayores a 1,000 toneladas de levaduras por los desagües de las destilerías de alcohol de caña. En la destilería de INCAUCA S.A.S se redirige la levadura, una parte termina en la planta de compostaje del ingenio y otras veces es punto de contaminación en el agua debido a que la planta entra tres veces al año en estado de liquidación y mantenimiento, consecuentemente se desaprovecha sustratos bioquímicos de interés, tales como proteínas, ácidos nucleicos y muchos elementos químicos como el nitrógeno.

Por ende el presente trabajo es un ejemplo del cambio mental que requieren nuestras industrias, en donde es necesaria la búsqueda constante de alternativas para el manejo directo de estas problemáticas. En este sentido se reduciría los costos operacionales, hacer al proceso mucho más sostenible dando un uso integral de la levadura reciclada de la fermentación para obtener hidrolizados con alto contenido de nitrógeno que permitan reemplazar la urea como única fuente de nitrógeno actual, y a su vez favorecer la viabilidad, dado que el hidrolizado también será una buena fuente de vitaminas.

Además de tener un consumo sostenible, también se disminuye el impacto ambiental generado por el proceso de fabricación de la urea, puesto que sí, se deja de consumir se estaría eliminando los impactos identificados en la matriz ambiental por el derroche de insumos. Esto es posible, gracias a que la levadura usada en los sistemas de fermentación poseen la capacidad de floculación, permitiendo ser recuperada y recirculada al sistema.

Al ser un proceso amigable con el medio ambiente puede acarrear un impacto económico, si se, es promovida con mayor auge ante la alta gerencia. En muchos casos los procesos alternativos además de ser favorables desde el punto de vista económico tienden a generar menos impactos negativos y no representa riesgos para la salud de los operadores, si no que contribuyen a la mejora de los procesos biotecnológicos.

4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La descarga de levadura hacia el ambiente trae como consecuencia problemas que pueden ser, tanto evidentes como no evidentes por lo que se sugiere que el exceso de levadura que se genera en procesos de fermentación pueda ser remediado y ser utilizado para la misma industria. Para dar respuesta a esta problemática se pretendió desarrollar una metodología sencilla basada en mecanismos de termólisis y plasmólisis para la hidrólisis de levadura reciclada de procesos de fermentación.

4.1 FORMULACION DEL PROBLEMA

Por ello se cuestiona que: ¿La levadura reciclada puede ser transformada en nitrógeno orgánico como nutriente en la formulación de la etapa de propagación en el sistema fermentativo de la destilería INCAUCA S.A.S; teniendo en cuenta la sostenibilidad y costos-efectividad de su tratamiento?

5. MARCO TEORICO

5.1. Características celulares de la levadura.

Las levaduras, por definición, son hongos unicelulares y organismos eucariotas que exhiben gran diversidad con respecto al diámetro celular, forma y color. Por ser un organismo eucarionte posee un alto grado de compartimentación celular, caracterizado por la presencia de su material hereditario dentro de un núcleo verdadero y estructuras subcelulares enmarcadas por membranas dentro de su citoplasma. Sus células usualmente son de forma ovalada, aunque pueden ser esféricas, elípticas o cilíndricas, su tamaño puede variar desde 1 a 12 μm de diámetro, resultando ser la especie *Saccharomyces cerevisiae* una de las más grandes, especialmente cuando se encuentra en forma hexaploide (Suárez-Machín, Garrido-Carralero, & Guevara-Rodríguez, 2016).

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Sus dimensiones son: 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides a veces cilíndricas y filamentosas. Puede fermentar glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta la lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. Su aireación óptima es de 0.6-0.9vvm (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Una característica destacada de la levadura es la gran proporción de las sustancias nitrogenadas que contiene. La cantidad varía mucho, al parecer de acuerdo a las condiciones de nutrición en las que la levadura se ha crecido, pero en general más de la mitad de la materia seca se compone de proteínas y de otros órganos nitrogenados. Los distintos componentes que están compuestos de nitrógeno son glucógeno, goma, mucílago, la grasa, materia resinosa, de celulosa y, junto con una buena proporción de los ingredientes minerales (Gonzalez Castañón, 2009).

Estos microorganismos tienen un papel importante en los procesos fermentativos, y comprenden un variado abanico de criaturas “especializadas” en panificación, vinificación, nutrición, usos farmacéuticos, usos cerveceros y destilería. En todos los casos, la especie más comúnmente utilizada es la levadura de cerveza, cuyo nombre científico, *Saccharomyces cerevisiae*, indica que se trata de un hongo que fermenta el azúcar de los cereales (*saccharo-mucus cerevisiae*) para producir

alcohol y dióxido de carbono (Lezcano, 2012). Cabe mencionar que la levadura que se encuentra en el cepario del laboratorio de microbiología de la destilería de INCAUCA S.A.S es el prototipo GRX II; es una *Saccharomyces cerevisiae* adaptada al proceso de fermentación de la empresa (*Por políticas de la empresa se reservan más características fisiológicas de la cepa*) y según el contenido de humedad final, comercialmente se puede clasificar en:

Levadura seca: Contiene aproximadamente 10% de humedad intramolecularmente y, en consecuencia, un 90% de sólidos. Es la misma levadura fresca que se ha deshidratado. Tiene una vida útil de 6 meses y no es imprescindible refrigerarla. Requiere hidratación para su uso debido a que se encuentra en estado liofilizado. Esta forma de presentación brinda al consumidor la posibilidad de almacenar el producto por un período prolongado y sin necesidad de mantenerlo refrigerado (Lezcano, 2012).

Industrialmente suelen haber más clasificaciones como:

- ❖ Levadura fresca o prensada. Contiene intramolecularmente un 70% de humedad y un 30% de sólidos (el art. 1.256 del Código Alimentario Argentino admite hasta un 75%). Su vida útil es de dos semanas y debe almacenarse refrigerada. Este producto es el que prefieren la industria panaderil tradicional y las pizzerías, que suelen adquirirlo en envases de 500 g., en tanto que el consumo casero recurre a formatos de 50 g (Lezcano, 2012).
- ❖ Levadura instantánea. Contiene un 5% de humedad. Su vida útil, envasada al vacío, es de 2 años. No requiere refrigeración para su mantenimiento ni rehidratación para su uso. Su extensa vida útil posibilita su comercialización en mercados alejados: se trata de un producto transable. Por cuestiones operativas y/o tecnológicas las industrias panificadoras pueden preferir esta forma de presentación (Lezcano, 2012).
- ❖ Levadura líquida. Hasta el año 1825, cuando la levadura prensada fue introducida por Tebbenhof, la levadura se vendía en forma líquida. El retorno a esta forma de presentación fue una respuesta de los fabricantes a los pedidos de las panificadoras industriales (Lezcano, 2012).
- ❖ Levadura desactivada. Se halla despojada de todo su poder de fermentación. En la masa, las membranas permiten el escape del contenido entero de la célula. Uno de sus componentes, el glutatión, tiene un efecto reductor sobre el gluten. Esto permite mejorar la maquinabilidad de las masas duras o de las que han alcanzado un alto nivel de maduración, y acelerar el desarrollo durante la mezcla de la masa logrando una disminución del 15% al 20% en el tiempo de procesamiento. Esto reduce la

oxidación de la masa durante la mezcla, por lo que mejora la conservación del sabor y la calidad aromática del producto final según es citado por la Cámara de la Unión Europea de la Industria de la Levadura (Lezcano, 2012).

5.2 El nitrógeno y el desarrollo de la fermentación.

La concentración de nitrógeno asimilable es el factor más influyente sobre la cinética en la mayoría de las fermentaciones. Durante la fase de crecimiento de las levaduras, el nitrógeno es rápidamente absorbido para sustentar la actividad anabólica, luego, en la fase no proliferativa, los requerimientos de nitrógeno son relativamente bajos. Un abundante nivel original en nitrógeno aumenta las tasas de crecimiento y rendimiento en biomasa y estimula la actividad fermentativa, adiciones más tardías de nitrógeno asimilable, tendrán un efecto más fuerte sobre la cinética del final de fermentación que el nivel original, pero no sobre las máximas poblaciones de levaduras.

Según Boulton (2013), uno de los macronutrientes más frecuentemente implicados en paralizaciones, cuando está en cantidades insuficientes, es el nitrógeno. Siguiendo la fermentación analíticamente se puede observar que la adición de nitrógeno asimilable en la mitad de la fermentación, junto con O_2 al final de la fase de crecimiento celular tiene efectos benéficos sobre la finalización de la fermentación alcohólica.

Por otro lado, la adición de aminoácidos específicos en la fase estacionaria de la fermentación prolonga la actividad fermentativa máxima, este efecto se produce porque estas adiciones parecen tener la habilidad de sintetizar rápidamente proteínas degradadas, tales como los transportadores de glucosa, esta propiedad parece ser mucho más importante que la utilización de los aminoácidos como una simple fuente de nitrógeno para sustentar el crecimiento. La efectividad de algunos aminoácidos como glicina, que tiene un alto valor estimulador en fermentaciones complicadas, fue mucho más alta que la de otros aminoácidos o mezclas de estos (Gonzalez Rojas, 2000).

Los aminoácidos por si solos, representan la principal fuente de nitrógeno para las levaduras. Sin embargo, las formas nitrogenadas más preferidas son generalmente, amonio en primer lugar y luego glutamato, debido a que se utilizan directamente en biosíntesis. La glutamina es también preferida debido a que puede generar amonio y glutamato. Las levaduras terminarán primero estas tres fuentes de nitrógeno, y solamente después atacarán el siguiente grupo en preferencia que incluye alanina, serina, treonina, aspartato, asparagina, urea y

arginina. Glicina, lisina, histidina, y las pirimidinas, timina y 4 timidina no pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno por la mayoría de las cepas de *Saccharomyces*, pero se pueden utilizar como precursores biosintéticos (Boulton, 2013).

Una de las formas más comunes de cuantificar el nitrógeno asimilable en mostos es el FAN (free alpha-amino nitrogen) o nitrógeno fácilmente aprovechable, el cual considera al amonio y a los aminoácidos menos la prolina, la cual normalmente en condiciones enológicas no es utilizada. La concentración de nitrógeno fácilmente aprovechable, contenido por el mosto justo antes de la siembra, nos indicará si es necesaria una corrección de este nutriente. Los niveles de amonio y aminoácidos (especialmente arginina), son de vital importancia para completar una exitosa fermentación alcohólica (Gonzalez Rojas, 2000).

5.3 Hidrolizados de levadura

Se denomina subproducto de una lisis, muerte celular asociada con el rompimiento de la pared celular, ocurriendo entre valores de pH 6- 6,5 aproximadamente, el cual es el pH interno de la célula (García, 2004).

5.3.1 Hidrolisis

Se produce con la presencia de enzimas hidrolíticas, las cuales son capaces de digerir la pared celular de la levadura compuesta por polisacáridos, esto ocurre desde afuera de la célula hacia adentro. (Otero & Cabello, 2010)

5.3.2 Autólisis

Se genera con la acción de las enzimas autolíticas presentes dentro de la célula de levadura, las cuales digieren la pared celular de adentro hacia fuera. Incluso en fase inactiva, la actividad metabólica continúa, aunque despacio, hasta agotar los nutrientes, allí acuden a lo que se llama canibalismo. Las células excretan enzimas que disuelven las paredes de células vecinas, haciendo disponible los nutrientes que esas células contienen. La levadura autolisada emite un olor sulfuroso muy desagradable (García, 2004).

Estos cambios moleculares pueden ser detectados con varios métodos de disrupción celular. Existen diferentes métodos para realizar la hidrólisis de las levaduras pudiendo agruparse estos en disrupción mecánica y no mecánicos (García, 2004).

5.3.1.1 Métodos mecánicos

Se basan en fuerzas de corte que deforman las células hasta el rompimiento de sus cubiertas. Suelen ser más efectivos que los métodos químicos. Generalmente son más fáciles de escalar que los no mecánicos. Son inespecíficos. Generan elevadas temperaturas. Requieren mucha energía. Pueden llegar a dañar productos lábiles. La separación del producto deseado de otros puede llegar a ser dificultosa. Su tratamiento puede ser por sonicadores (ultrasonido), homogeneizadores de alta presión, microfluizadores y molinos de perlas (Balasundaram *et al*, 2009 & Stowers, *et al* 2007).

5.4.2 Métodos no-mecánicos

Son fáciles de escalar, si uno necesita tratar 10 veces más materia orgánica basta con adicionar 10 veces más reactivo químico o enzima. Estos rompen las cubiertas celulares induciendo la lisis celular, a través de medios químicos, físicos o enzimáticos. Por lo general son menos severos que los mecánicos. No generan grandes daños a la célula, facilitando la posterior purificación del producto de interés. Son más específicos. Por sí mismos, estos métodos no suelen ser muy eficientes. Pocos métodos no mecánicos pueden llegar a ser escalados exitosamente. Su tratamiento se divide en tres subclases:

(Balasundaram *et al*, 2009 & Stowers, *et al* 2007).

- **Químicos:** Solventes orgánicos (cloroformo, tolueno), álcalis (hidróxido de sodio) con ácido (A. Clorhídrico), agentes caotrópicos (urea, clorhidrato de guanidina), agentes quelantes (EDTA), antibióticos, detergentes (SDS, pH ácido y triton-X).
- **Físicos:** Shock osmótico (Plasmólisis), congelamiento y descongelamiento, Descompresión y termólisis.
- **Biológicos:** Enzimáticos y autólisis.

5.5 Evaluación de la eficiencia de los métodos de ruptura celular.

Suele darse por métodos directos, los cuales consisten en contar el número total de células destruidas e intactas. Puede ser por recuentos en cámara, contadores electrónicos, recuentos en placa y utilización de centrífugas analíticas.

Los métodos indirectos, consisten en determinar el grado de liberación al medio externo de algún metabolito celular luego de que las membranas celulares son destruidas (determinación de proteínas solubles, actividades enzimáticas y porcentaje de rendimientos, etc.) (Gonzalez Castañón, 2009).

La técnica de ruptura celular seleccionada determina el tamaño de los desechos y la influencia que tendrán en las operaciones que se utilicen para su separación.

Por eso el tratamiento en el que se pretende destruir la pared celular de las levaduras facilita la recuperación de productos intracelulares y obtener mayor beneficios para el proceso de fermentación en industria de Destilerías.

Diferentes métodos pueden ser usados dependiendo de la composición de la pared celular de las levaduras y de los productos a obtener, el tipo de disrupción celular empleada en este trabajo fue por medio de métodos no mecánicos, como termólisis y plasmólisis, ya que estudios aplicados a levaduras ofrecen mayor porcentaje de eficiencia de extracción. (Serrano, Brizuela, & Rodríguez, 1994)

5.5.1 Termolisis

Es cuando las células son llevadas a mayores temperaturas con el fin de romper o debilitar la membrana externa. (Otero & Cabello, 2007)

5.5.2 Plasmólisis

Se da a través de la presión osmótica, con la presencia de agentes plasmolíticos como cloruro de sodio, ácido fórmico o solventes como el acetato de etilo. Para acelerar la muerte y el rompimiento de las células a nivel industrial, éstas se exponen a temperaturas relativamente altas (García, 2004 & Salari et al, 2013)

5.6 Proceso de obtención de alcohol carburante en la Destilería INCAUCA S.A.S

Dando respuesta a la necesidad planteada por el Gobierno y a la visión, compromiso y liderazgo de la Organización Ardilla Lülle, Incauca puso en marcha el 28 de octubre de 2005 la primera planta de alcohol carburante más grande y moderna del País, con una capacidad de producción de 350.000 litros de alcohol diarios en operación continua. El etanol se utiliza como aditivo para la gasolina con el fin de mejorar el octanaje y disminuir la contaminación generada por los gases de combustión. Desde octubre de 2005, la mezcla está compuesta en un 90% por gasolina y un 10% por etanol, según lo dispuesto por la legislación colombiana. La destilación de alcohol, es un proceso que consiste de 6 etapas principalmente: Recepción y almacenamiento de materia prima e insumos, Fermentación, Destilación, Evaporación de Vinaza, Deshidratación y Almacenamiento del producto.

Fermentación: Las principales materias primas que se utilizan en la destilería son la miel B, la meladura y el jugo clarificado, provenientes de la fábrica de azúcar. El proceso de fermentación consiste en convertir los azúcares presentes en la materia prima que vienen de la fábrica, en etanol y gas carbónico, por medio de la

acción de levaduras. La fermentación se desarrolla por medio de un proceso continuo de cinco reactores que trabajan en serie (311-312-313-314-315), donde se llevan a cabo las reacciones químicas de transformación de azúcar en etanol y gas carbónico. Al salir del último fermentador, se obtiene un producto conocido como mosto o vino fermentado (335) que contiene una concentración de 9% (v/v) de alcohol. Además, contiene agua, sólidos y levadura, que se recupera en el tanque de sedimentación (S-331) para ser usada nuevamente en el proceso. La levadura recuperada, se envía al tanque de acidulación (S- 304) donde se hace un choque con ácido sulfúrico para reducir la contaminación bacteriana presente y nuevamente se recircula a los fermentadores para continuar con el proceso de producción. El mosto o vino fermentado (se envía al proceso de destilación para continuar la separación del etanol producido.

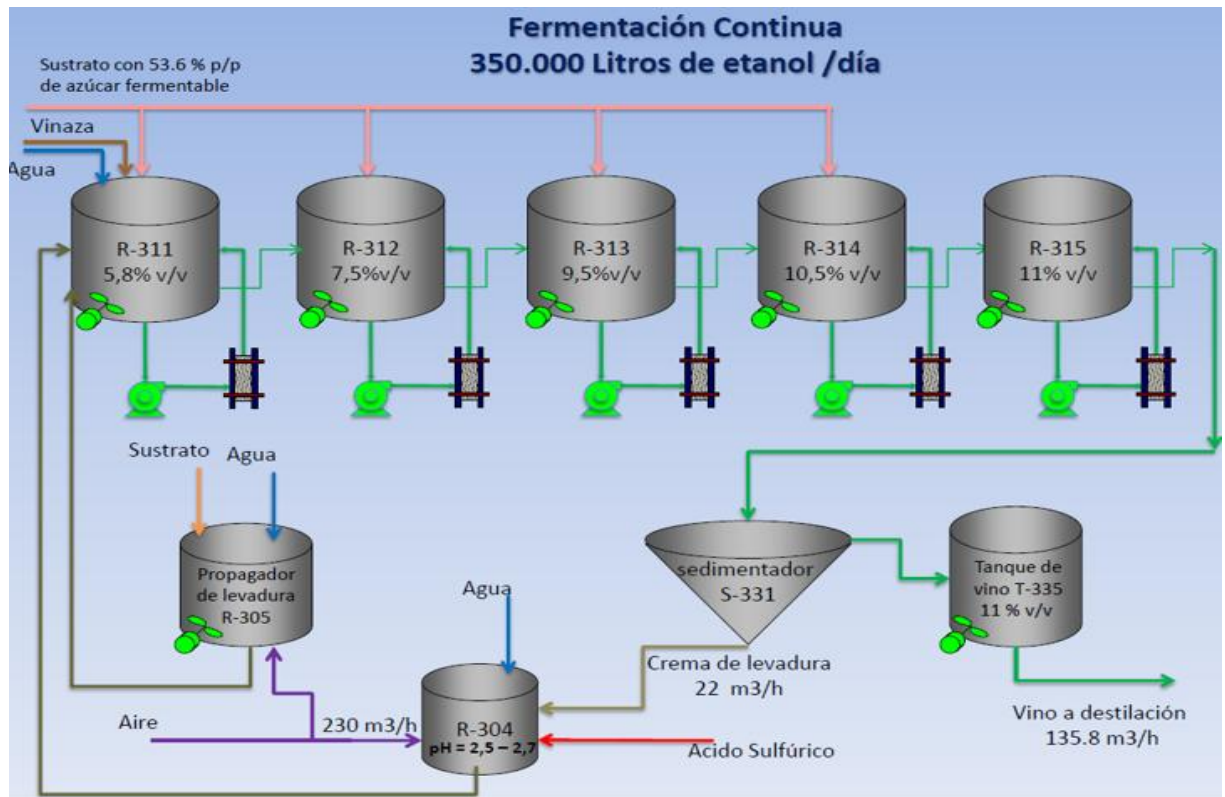


Figura 1. Diagrama del sistema de fermentación de INCAUCA S.A.S

(FUENTE: INCAUCA S.A.S, 2017)

Destilación: En la destilación se purifica el mosto fermentado para obtener alcohol con una pureza del 96% (v/v). Para ello, la planta cuenta con dos columnas de destilación en serie que operan al vacío, aumentando así la eficiencia energética del proceso. La destilación es un proceso de separación por diferencias en los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla, que al ser sometidos al calor, los compuestos más volátiles como el alcohol se evaporan y se concentran en fase de vapor. El mosto fermentado que proviene de la sección de fermentación contiene 9% de alcohol, además de agua, gases, sólidos disueltos y otros compuestos que deben retirarse. Para ello, se envía a la columna mostera donde se obtienen dos productos: por la parte superior se obtienen gases con una concentración de alcohol entre el 40-50% v/v que se envían a la segunda columna llamada rectificadora. Por la parte inferior se obtiene una corriente líquida llamada vinaza. El 60% de la vinaza generada se envía a la sección de fermentación y el 40% restante hacia los evaporadores de vinaza donde se concentra para su posterior uso en compostaje. La relación final de vinaza concentrada producida es de alrededor de 1,5 litros de vinaza por litro de alcohol anhidro. De la segunda columna de destilación se obtiene el alcohol rectificado por encima de una concentración de 96% v/v el cual se envía hacia la zona de deshidratación. De los platos intermedios de esta columna se extrae el aceite de Fusel y por el fondo se obtienen las flemazas, que se envían a la planta de tratamiento de aguas residuales.

Deshidratación: El alcohol purificado en la destilación contiene 96% v/v de etanol y 4% v/v de agua. Para que este alcohol pueda ser usado como combustible, es necesario retirarle más agua. La deshidratación tiene lugar en los tamices moleculares, que por medio de una resina sintética retiene el agua contenida en el alcohol rectificado, para obtener como producto alcohol deshidratado con una concentración mínima del 99.5% de etanol, cumpliendo con las especificaciones para su uso como alcohol carburante. El alcohol deshidratado o alcohol anhidro se condensa y enfría para ser almacenado.

Almacenamiento: La destilería cuenta con una zona de almacenamiento y despacho para el producto terminado. Existen dos tanques de 112 m³ recibidores de alcohol anhidro a donde se dirige la producción de la destilería y se realizan pruebas de calidad. El alcohol anhidro certificado se almacena en tres tanques de tres millones de litros cada uno, con capacidad para 25 días de inventario. Además, hay un tanque para alcohol rectificado (595 m³), otro para alcohol impuro (75 m³), aceite de Fusel (10 m³) y gasolina (152 m³), todos construidos en acero carbón.

Sistema Contra Incendios: La destilería posee un sistema contra incendios de última tecnología, conformado por un sistema de detección de humo, vapores de alcohol y llama, que trabajan conjuntamente y asociados a dos anillos de agua contra incendios y agua-espuma (resistente al alcohol ARAFFF).

Planta de Tratamiento de Aguas Residuales: La planta de tratamiento de aguas residuales de la destilería recibe las flemazas y los condensados de la concentración de vinaza.

Compostaje: La planta de compostaje de INCAUCA es un sistema de tratamiento de residuos industriales de la fabricación de azúcar y alcohol carburante, que comprende residuos de cosecha, cachaza, ceniza de bagazo, bagazo y vinaza. Cuenta con dos plantas de tratamiento: Composmatic y Backhus. La primera con una capacidad instalada de tratamiento de 150 toneladas de residuos sólidos y 50 toneladas de vinaza; la segunda con capacidad de 550 toneladas de residuos sólidos y 150 toneladas de vinaza, para un total de tratamiento de 900 toneladas por día de residuos orgánicos.¹

¹ PROCESOS DE INCAUCA S.A.S http://www.incauca.com/wp-content/uploads/2016/05/PROCESOS_ESPANOL.pdf (Todo el ítem 5.7)

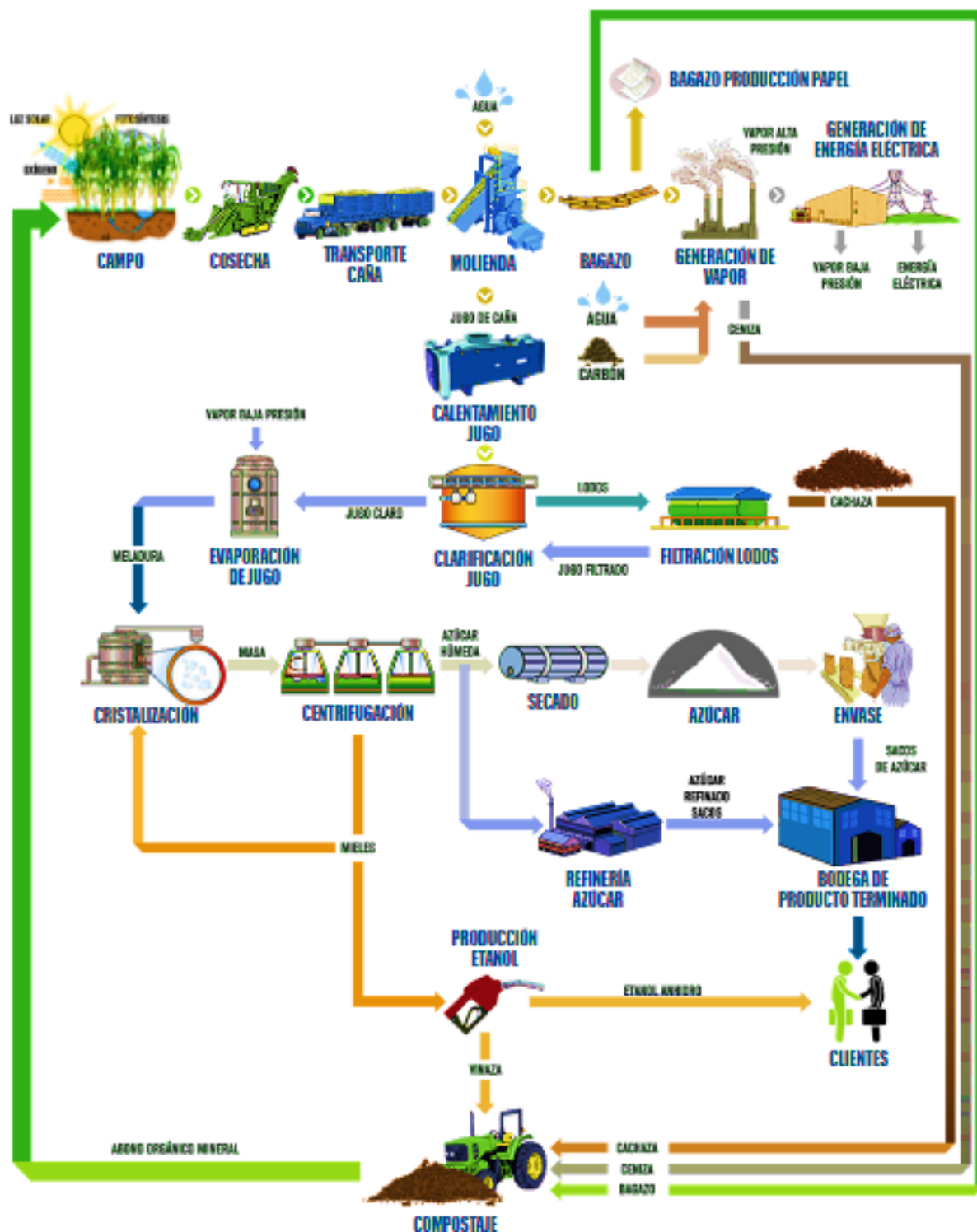


Figura 2. Diagrama de procesos de INCAUCA S.A.S

(FUENTE: Procesos de INCAUCA S.A.S en <http://www.incauca.com/es/procesos/>)

5.7 ANTECEDENTES

Actualmente existen pocos estudios que relacionen los métodos de Plasmolisis y termolisis como tratamientos de alta eficiencia para obtener hidrolizados líquidos de levadura. Durante años, diferentes investigaciones se han centrado en el potencial del uso de hidrolizados de levadura residual, con fines alimenticios para animales y en humanos comercializándose principalmente por su valor nutricional y por sus cualidades como saborizantes esto según la Asociación Europea para los Productos Especiales de la Levadura (EURASYP). El extracto de levadura al igual que los extractos de carne, vegetales, pescado y otros similares, se emplean más que todo como saborizantes naturales y poseen un carácter gustativo complejo que incluye diferentes sabores y una riqueza no encontrada en los saborizantes de naturaleza química, tales como salsas, sopas, snacks saborizados y comidas preparadas, entre otros. Su adopción como ingrediente en las versiones “bajas en sodio” de estos productos permite lograr el sabor que el consumidor espera encontrar (Otero & Cabello, 2010).

Precisamente estos productos son un auge en el mercado brasileño y se declara que continuará creciendo esto según las empresas como USINA JARDEST y USINA NARDINI de Ribeirao Preto- Brasil, donde reportan tecnologías aplicadas al proceso de secado de levadura para usos alimenticios en animales (Figuroa & Villegas, 2012). Ambos protocolos de secado de levadura tienen explícitamente en sus etapas los procesos de termolisis y Plasmolisis usando temperaturas (100°C y 50° respectivamente).

Estudios por Serrano (2007), recomiendan trabajar con temperaturas de 30 y 50 °C para hidrolizar levadura. Estas temperaturas fueron seleccionadas después de hacer un estudio cinético de hidrólisis por Serrano (1994), donde se determinó un rango de 30 a 80 °C a diferentes tiempos y concentraciones de levadura y NaOH, lograron obtener el nitrógeno amínico liberado.

En el campo industrial existen empresas como Angel Yeast Co., Ltd, fundada en 1986, empresa de levadura catalogada como de alta tecnología en China, la cual se especializa en la producción de levadura y derivados de levaduras. Como uno de los productores más grandes de levadura y extracto de levadura en el mundo, hasta ahora Angel ha establecido diez plantas en China y Egipto (Lezcano, 2012).

En los últimos tres años la empresa CALSA modernizó integralmente su fábrica de levaduras, ubicada en el Parque Industrial El Manantial, de San Miguel de Tucumán, convirtiéndola en un establecimiento altamente automatizado, con equipamiento de última generación. Allí produce extracto de levadura, levadura envasada en presentaciones de 50 y 500 gramos, y levadura en estado líquido, que vende a grandes panificadoras directamente (Lezcano, 2012).

Sin embargo, se cuenta con muy poca información en el uso de extractos de levadura obtenidos de la biomasa residual en las fermentaciones alcohólicas, por lo que aún sigue siendo un eslabón poco explorado en las Destilerías. Esta búsqueda se hace viable y atractiva para ampliar e innovar tecnologías biotecnológicas autosostenibles para procesos industriales en Colombia y el mundo.

6. METODOLOGIA

Para el desarrollo de la metodología se dividió el procedimiento en tres etapas: la número 1 y 2 se le designó como **líneas bases experimentales con R-305 y S-331** respectivamente, finalmente la etapa 3: **Obtención de Nitrógeno total y % FAN**. Una gran cantidad de productos de interés son intracelulares y para obtenerlos se precisa la desintegración de la célula para liberar su contenido al medio. Por consiguiente nuestro estudio tuvo énfasis en dos mecanismos de hidrólisis: Termólisis y Plasmólisis; donde el primero consiste en someter células vivas a una temperatura constante mayor a 100 °C. En la plasmólisis una célula se someten a altas concentración de sal y moderada temperatura (Otero & Cabello, 2007) (Figuroa & Villegas, 2012). Ambos mecanismos se emplean en las tres etapas anteriormente nombradas.

6.1 Obtención de materias primas

Inicialmente se tomó muestras del tanque propagador R-305 para la etapa 1 y para las dos últimas etapas se trabajó con la levadura de interés obtenida del tanque sedimentador S- 331, provenientes de la planta de producción de alcohol carburante INCAUCA S.A.S. (ver figura 1)

El R- 305 es un tanque metálico cilíndrico herméticamente cerrado donde se realiza la propagación de levadura pura, la cual proviene de una propagación a nivel de laboratorio de la cepa madre de levadura. Al tanque se inocula levadura y se le dosifica aire estéril y mosto, reproduciéndose la levadura para luego ser dosificada a los fermentadores; cabe destacar que este proceso se realiza con esterilidad total. Contiene el 95% de levadura viva con respecto a levadura muerta. R- 305, como materia prima, es costoso por lo que se usa solo en la etapa 1 debido a que es levadura fresca.

El S-331, también llamado sedimentador. Es el tanque donde se recolecta la levadura que sale del último fermentador, se encuentra compuesto mayormente de células muertas que de levadura viva. Es la materia prima de interés debido a solo el 6 % vuelve a recircularse al sistema. Dejando un exceso de descarga de levadura próxima a otros usos.

6.2 Proceso experimental

En el estudio se evaluó 2 variables para la hidrólisis: Temperatura y Concentración de NaCl , con un seguimiento mediante métodos directos por recuento de células en cámara de Neubauer, (ver apartado 6.3.5) y a su vez efectuando análisis indirectos como : % Nitrógeno Amino Libre (FAN) y Nitrógeno total (TN) a los biopreparados (Ver apartado 6.3.2 y 6.3.3).

Los mecanismos de termólisis y plasmólisis fueron desarrollados en un tanque R-301 de un volumen de $(0,25 \text{ m}^3)$. A este se le proporciono condiciones de (aire-agitación, antiespumante, vapor y agua) y se trabajó con aproximadamente un 70% de nivel, siendo regulado cada vez con la adición de agua de proceso (Ver figura 3.) (Otero & Cabello, 2007) (Figueroa & Villegas, 2012).

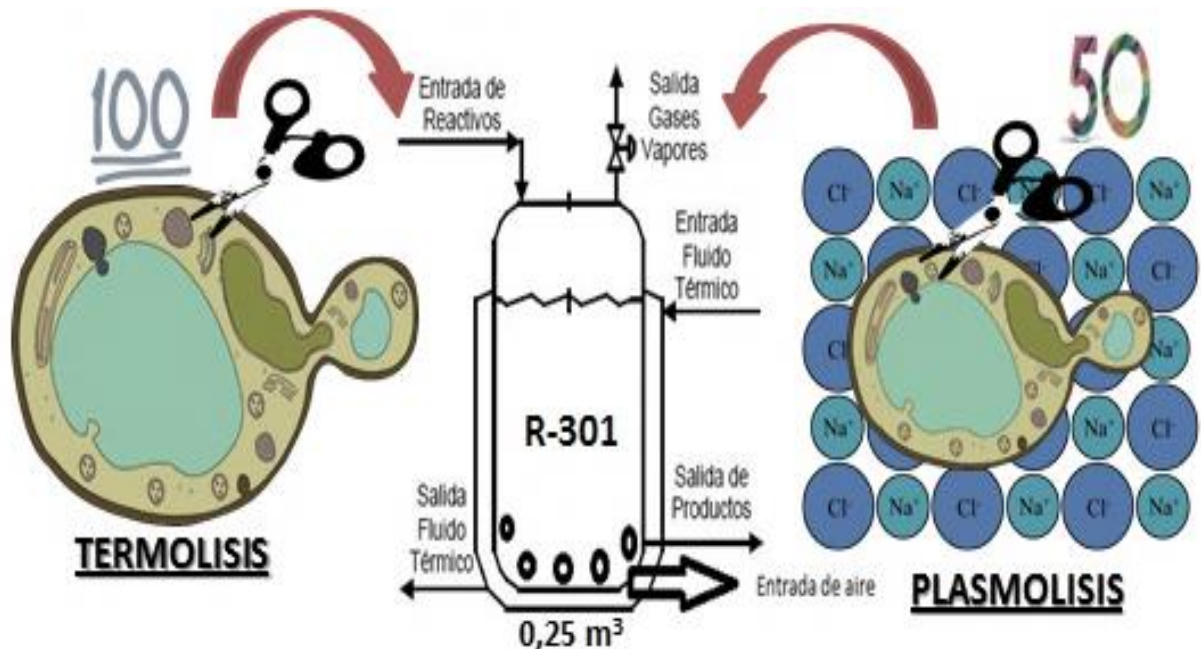


Figura 3. Modelo del reactor R-301 con los dos tratamientos de hidrólisis.

**Por política de la empresa no es posible acceder a una imagen real del reactor trabajado en planta, por lo que se esquematiza uno con iguales condiciones.*

Los tratamientos de hidrolisis se llevaron a cabo en un reactor cilíndrico de acero inoxidable, cerrado y enchaquetado, que se agita mediante burbujeo de entrada de aire en la parte inferior (ver figura 3). Esta clase de agitación no es la mejor pero garantizan la homogeneidad del sistema. El reactor es inoculado en el arranque y medido su nivel al adicionarle agua contantemente.

6.2.1 ETAPA 1: Línea base experimental con levadura del R-305

Se comenzó con un análisis preliminar que consistió en determinar si una hidrolisis es efectiva solo con células vivas. Por ello se tuvo en cuenta el uso de levadura viva del tanque propagador R-305.

Con el fin de dirigir el trabajo, se hace necesario generar este preámbulo para derrotar la hipótesis de si es o no posible hidrolizar levadura y en qué condiciones es posible esto. En esta etapa se realizó un tratamiento por termolisis y otro por Plasmolisis usando mosto del propagador 305.

Para preparar los ensayos respectivos a cada tratamiento se tuvo que tener en cuenta el volumen final que se quiere llevar a hidrolizar. Para los ensayos de termólisis fue de 100 Lt y para plasmólisis fue de 120 Lt, arrojando un nivel del tanque P-301 de 70% aproximadamente. Estos ensayos difieren en temperatura y concentración, según muestra las formulaciones en la siguiente tabla:

Tabla 1. Parámetros de formulación de los biopreparados según el método de hidrolisis empleado con R-305.

TERMOLISIS			PLASMOLISIS		
ENSAYO	COMPONENTES	T°	ENSAYO	COMPONENTES	T°
1	LEVADURA R-305	100 °C	2	LEVADURA R-305	50° C
				AGUA	
				SAL	

(FUENTE: Castellanos Portillo, 2017)

(Por políticas de la empresa se reservan volúmenes y porcentajes)

Según las etapas del diagrama 1, los tratamientos de termolisis solo se hizo necesario añadir levadura del R-305 y someter a 100°C. Para el caso de plasmolisis es necesario agregar aparte de levadura, agua, sal y someter a 50 °C.

Luego de tener los biopreparados listos es decir los puntos 1 y 2 del diagrama 1, se tomó inicialmente una muestra individual y se hace un recuento celular inicial, antes de empezar cada proceso. (ver apartado 6.3.5) Luego de un lapso de cada

20 minutos se toman muestras de los hidrolizados en proceso y se les determino también el porcentaje de rendimiento de levadura hidrolizada por recuento celular por cámara de Neubauer.



Diagrama 1. Planteamiento básico de la etapa 1 con levadura R-305

(FUENTE: Castellanos Portillo, 2017)

6.2.2 ETAPA 2: Línea base experimental con la levadura reciclada S-331

Para este caso, los ensayos siguen manteniendo las mismas características del ensayo de línea base con 305 pero difieren solo en el tipo de levadura añadida al ensayo que es la levadura del S-331. (Ver diagrama 2). Con este ensayo se quiso corroborar que no es posible hidrolizar células de levadura muerta.

Según las etapas del diagrama 2, los tratamientos de termolisis solo se hizo necesario añadir levadura del S-331 y someter a 100°C. Para el caso de plasmólisis es necesario agregar aparte de levadura S-331, agua, sal y someter a 50 °C (Ver tabla 2).

Luego de tener los biopreparados listos es decir los puntos 1 y 2 del diagrama 2, se tomó inicialmente una muestra individual y se hace un recuento celular inicial, antes de empezar cada proceso. Luego de un lapso de cada 20 minutos se toman muestras de los hidrolizados en proceso y se les determino también el porcentaje de rendimiento de levadura hidrolizada por recuento celular por cámara de Neubauer.

Tabla 2. Parámetros de formulación de los biopreparados según el método de hidrolisis empleado con S-331

TERMOLISIS			PLASMOLISIS		
ENSAYO	COMPONENTES	T°	ENSAYO	COMPONENTES	T°
3	LEVADURA S-331	100°C	4	LEVADURA S-331	50° C
				AGUA	
				SAL	

(FUENTE: Castellanos Portillo, 2017)

(Por políticas de la empresa se reservan volúmenes y porcentajes)

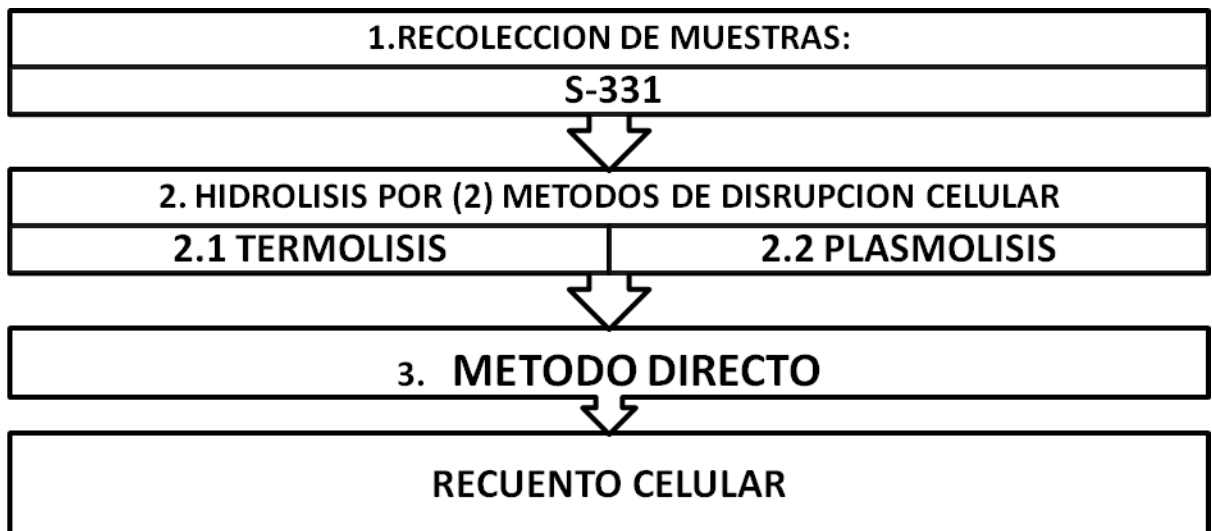


Diagrama 2. Planteamiento básico de la etapa 2 con la levadura reciclada.

(FUENTE: Castellanos Portillo, 2017)

6.2.3 ETAPA 3: Obtención de nitrógeno total y % FAN a partir de levadura reciclada S-331.

Estos últimos ensayos fueron elaborados con el fin de obtener el producto final al cual se le realizó la medición de Nitrógeno total para poder determinar la eficiencia de los dos métodos de hidrolisis. Este difiere de las dos primeras etapas en cuanto a que se añade al proceso centrifugaciones, las cuales se detallan en el diagrama (Ver diagrama 3).

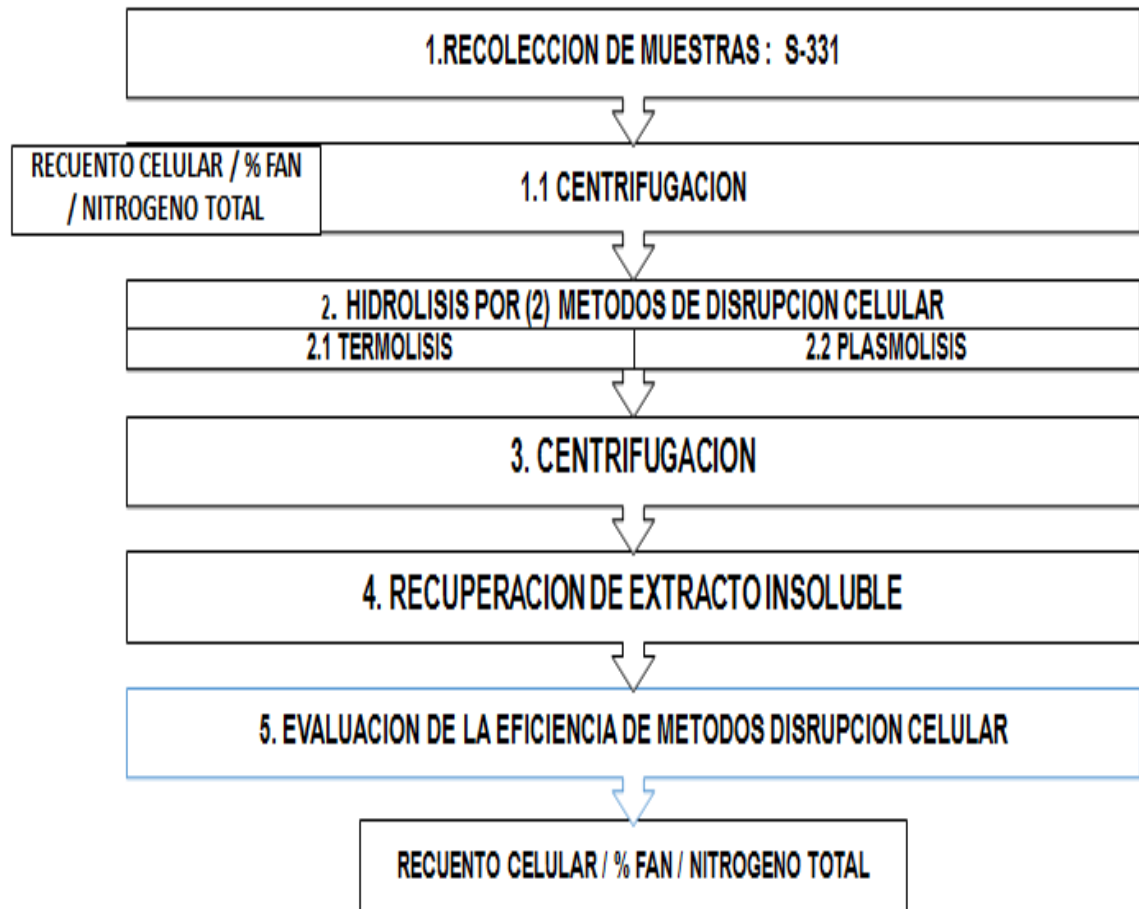


Diagrama 3. Planteamiento básico de la etapa 3 con la levadura reciclada.

(FUENTE: Castellanos Portillo, 2017)

(Por políticas de la empresa se reservan volúmenes y porcentajes)

Según las etapas del diagrama 3, los tratamientos de termolisis solo se hizo necesario añadir levadura del S-331 y someter a 100°C. Para el caso de plasmólisis es necesario agregar aparte de levadura S-331, agua, sal y someter a 50 °C (ver tabla 2).

Esta etapa difiere de la 1 y 2 por el paso 5 donde se evalúa la eficiencia de los métodos de disrupción celular por medio de análisis indirectos (FAN y TN).

Luego de tener los biopreparados listos es decir los puntos 1 y 2 del diagrama 3, se tomó inicialmente una muestra individual y se llevó a centrifugación a 13000 rpm por 10 minutos, con el fin de separar el material soluble (Sobrenadante: Extracto líquido) e insoluble del (Extracto sólido: Biomasa no hidrolizada). Esto se realizó al inicio y final de los procesos de termólisis y plasmólisis (puntos 1.1 y 3).

El extracto líquido o sobrenadante se recuperó hasta obtener volúmenes significativos que permitieron determinar el recuento celular por cámara de Neubauer, % Nitrógeno Amino Libre (FAN) y el de Nitrógeno Total (%TN). Luego de un lapso de cada 20 minutos se toman muestras de los hidrolizados en proceso y se les determinó también el porcentaje de rendimiento de levadura hidrolizada por recuento celular por cámara de Neubauer.

6.3 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos complementarios

6.3.2 Determinación de % Nitrógeno Amino Libre (FAN)

Se toman 100 mL de muestra se le determina pH y se va agregando Hidróxido de Sodio hasta dejarlo en básico (pH 8), luego se agregan 25 mL de Formaldehído (CH₂O). Después se realiza la medición con un equipo titulador automático (Praj, 2004)

$$FAN (mg/L) = \frac{NaOH\ 0,1N \times 1,4 \times 1000}{ml\ materia\ prima} \quad (\text{Ecuación 1})$$

**Este análisis es realizado por el laboratorio Fisicoquímico de INCAUCA S.A.S*

6.3.3 Determinación de Nitrógeno total (TN)

El método más comúnmente utilizado para la determinación de nitrógeno orgánico es el llamado método Kjeldahl, este fue desarrollado por un laboratorio externo. Se basa en una volumetría ácido-base. Se caracteriza por el uso de ebullición, ácido sulfúrico concentrado que efectúa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco el amonio es retenido como bisulfato de amonio y puede ser determinado *in situ* o por destilación alcalina y titulación. En el método Kjeldahl, la muestra se descompone en caliente medio sulfúrico, en presencia de un agente reductor catalizador (mercurio, cobre o selenio). También suele adicionarse una sal neutra para aumentar el punto de ebullición de la disolución de ácido sulfúrico. De esta forma que aumenta temperatura de trabajo, con lo cual se favorece la descomposición. El tratamiento transforma el nitrógeno de la muestra en NH₄⁺. La posterior adición de una base fuerte libera el NH₃, que es arrastrado hasta un frasco colector por destilación en corriente de vapor.

El frasco colector contiene un volumen medido de una disolución estándar de ácido, de forma que una fracción de ácido es neutralizada por el NH₃. Al finalizar la destilación se procede a valorar el ácido no consumido con una disolución de base patrón. El volumen de disolución básica consumido hasta llegar al punto de

equivalencia permite conocer la cantidad de NH₃, y de esta forma, la cantidad de nitrógeno en la muestra.²

6.3.4 Estimación del porcentaje de rendimiento (%R) de levadura hidrolizada.

Para hallar A: (Porcentaje de levadura no hidrolizada)

$$A = \frac{H_f \times 100}{H_i} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde H_f, es el número de células de levadura contadas al haberse finalizado el ensayo.

H_i, es el número de células de levadura contadas antes de iniciar el ensayo.

Se calculó el porcentaje de hidrolisis (B) de cada ensayo aplicado. Según la siguiente fórmula:

$$100 - A = B \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde A, es el porcentaje de levadura sin hidrolizar.

B, es el porcentaje de levadura hidrolizada, también es (%R).

6.3.4.1 Estimación total de los Millones de levadura Hidrolizada (MLH) durante los tratamientos.

Para hallar MLH:

$$MLH = H_i - H_f \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde:

H_i, es el número total de células (vivas + muertas) de levadura contadas antes de iniciar el ensayo.

H_f, es el número total de células (vivas + muertas) de levadura contadas al haberse finalizado el ensayo.

² <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>

6.3.5 Determinación numérica por conteo de levadura mediante la Cámara de Neubauer

Los biopreparados con S-331 se debieron diluir debido a que son cremas muy concentradas. Para el caso de los biopreparados con muestra del tanque R-305 se omitió este paso y se toma 1 ml directamente. Para ello se debe agitar muy bien, luego con ayuda de micropipeta se tomó un 1 mL el cual se añade a un balón de 100 ml que contiene 50 mL de Agua de proceso. Luego se adiciono 9 ml de látex natural de papaína y de 7- 10 gotas de solución acuosa de azul de metileno de 0,1 %(w/v). Se debió completar el volumen con agua y agitar hasta homogenizar la muestra ya que es importante que antes de colocar la muestra en la cámara exista una efectiva agitación por la característica floculante de la levadura. Después se colocó un cuarzo sobre la cámara de conteo y se aseguró que ambos lados de la placa están apoyados sobre la parte saliente de la misma. Se tomó una muestra de la dilución con una pipeta Pasteur y se colocó su punta en el agujero de llenado de la cámara y cuidadosamente se descargó la muestra de la pipeta. Se debió asegurar que no se haya formado burbujas de aire en la cámara de conteo. Seguido se colocó la placa bajo el microscopio y se inició a enfocar en 40 X donde se contó las células presentes. Se contó los 25 cuadros de la cuadrícula central, contando así las células de las dos líneas finales del recuadro hacia adentro (Praj, 2004).

7. Actividades Complementarias

- Toma de muestras en la planta.
- Lavado de material contaminado y elaboración de material estéril
- Elaboración de fases propagativas (I y II) de levadura para iniciar propagación en la fermentación de la destilería.
- Inoculación de fases propagativas
- Prueba de Ácido Láctico (a materia prima, fermentadores)
- Conteo Levadura en cámara Neubauer
- Conteo Macroscópico de cajas de análisis de fermentadores, materias primas y aguas de proceso
- Análisis microbiológico de materias primas
- Análisis microbiológico de aguas de proceso
- Análisis microbiológico de tren fermentativo
- Análisis microbiológico de muestras adicionales

- Seguimiento microbiológico de muestras especiales (Inóculos , colchones en reactores y ensayos de antibióticos)
- Control microbiológico de Sanitizaciones
- Actualización e interpretación de datos (Excel y software SIGING).

8. Análisis Estadístico

En el estudio se empleó un diseño básico no probabilístico y un tipo de muestreo por conveniencia ya que el número de muestras analizar no genera un marco muestral y, por lo tanto, no se conoce la probabilidad de que cada variable sea seleccionado para la muestra. (Pimienta Lastra, 2000).

Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas con la media aritmética, Desviación estándar, Coeficiente de variación, porcentaje de variación y presentaciones gráficas.

Para la discusión de resultados obtenidos, se utilizó el análisis de ANOVA, para dos tratamientos con el fin de establecer cuál de los dos métodos de ruptura celular estudiados es el más adecuado para el mayor porcentaje de extracción de nitrógeno total.

Adicionalmente, estos datos se tabularon mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad del estudio.

Para este análisis se manejó una **PRUEBA DE HIPOTESIS GENERAL**: Donde la hipótesis nula (H_0): La extracción de nitrógeno total obtenida con el método de termólisis (T) no difiere significativamente del obtenido de la extracción por plasmólisis (P)

$$H_0 \quad T = P$$

y la hipótesis alternativa (H_a) : La extracción de nitrógeno total obtenida con el método de termólisis (T) si difiere significativamente del obtenido de la extracción por plasmólisis (P).

$$H_a \quad T \neq P$$

Este análisis estadístico fue aplicado solo a la etapa 3 (Armitage P, 1994).

10. RESULTADOS

Debido al escalamiento experimental del proyecto se obtienen resultados de las tres diferentes etapas del proceso de obtención de nitrógeno total por medio de dos métodos de hidrólisis de levadura (termólisis y plasmólisis). Donde en la primera etapa se obtiene resultados favorables para seguir escalando el proceso.

ETAPA 1. LINEA BASE EXPERIMENTAL CON LEVADURA R-305

Tabla 4. Ensayo por termólisis en tanque R-301 con levadura del R-305

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL
1	0 h.	F1	100	270	23	293
	20 mn.	F1	100	0	173	173
	40 mn.	F1	100	0	199	199
	60 mn.	F1	100	0	247	247
	80 mn.	F1	100	0	236	236
	100mn	F1	100	0	239	239
	120 mn.	F1	100	0	243	243
				%R	MLH	
				17,0648464	50	

* %R, Es el porcentaje de rendimiento de la levadura hidrolizada (Ver ecuación 3)

*MLH, Millones de levadura Hidrolizada (Ver ecuación 4)

Tabla 5 . Ensayo por plasmólisis en tanque R-301 con levadura del R-305.

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL
2	0 h	F2	50	328	16	344
	30 mn.	F2	50	0	217	217
	60 mn.	F2	50	0	209	209
	90 mn.	F2	50	0	178	178
	120mn.	F2	50	0	163	163
	150 mn.	F2	50	0	142	142
	180mn.	F2	50	0	147	147
	210 mn.	F2	50	0	53	53
				%R	MLH	
				84,5930233	291	

Según las tablas 4 y 5 el método de termólisis arrojó un %R = 17 en comparación con el método de plasmólisis el cual fue mucho mayor %R= 85. Contrastando así, con el número de MLH donde también es mayor para el método de plasmólisis (MLH= 291).

ETAPA 2. LINEA BASE EXPERIMENTAL CON LEVADURA RECICLADA S-331

Debido al satisfactorio proceso de hidrolisis con la muestra de R-305 se requirió trabajar con la muestra de interés S-331. El cual arrojó datos aún mejores que el de la etapa 1.

Tabla 6. Ensayo por termólisis en tanque R-301 con crema del S-331

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL
3	0 h	F3	100	550	1810	2360
	2 h	F3	100	0	2020	2020
	4 h	F3	100	0	1900	1900
	16 h	F3	100	0	1780	1780
	18 h	F3	100	0	1680	1680
	20 h	F3	100	0	1610	1610
	22 h	F3	100	0	1570	1570
	24 h	F3	100	0	1520	1520
	29 h	F3	100	0	1440	1440
	40 h	F3	100	0	1380	1380
	42 h	F3	100	0	1320	1320
	44 h	F3	100	0	1290	1290
	46 h	F3	100	0	1260	1260
	48 h	F3	100	0	1230	1230
%R				MLH		
47,8813559				1130		

Tabla 7. Ensayo por plasmólisis en tanque R-301 con crema del S-331

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL
4	0 h	F4	50	320	1790	2110
	16 h	F4	50	0	1680	1680
	18 h	F4	50	0	1500	1500
	20 h	F4	50	0	1380	1380
	22 h	F4	50	0	1270	1270
	24 h	F4	50	0	1180	1180
	40 h	F4	50	0	1120	1120
	42 h	F4	50	0	1030	1030
	46 h	F4	50	0	1022	1022
	48 h	F4	50	0	1000	1000
	%R				MLH	
52,6066351				1110		

Según se muestra en las tablas 6 y 7 el método de termólisis arrojó un %R = 47 en comparación con el método de ruptura celular por plasmólisis el cual fue de %R=52. Contrastando así, con el número de MLH donde los puntajes de ambos métodos fueron similares.

NOTA: En las etapas 1 y 2 no se realiza análisis indirectos como FAN y TN, debido a que se quiere manejar la relación: a mayor número de levaduras hidrolizadas (MLH) mayor es el porcentaje de rendimiento (%R).

ETAPA 3. OBTENCION DE NITROGENO TOTAL Y % FAN CON LEVADURA RECICLADA DEL S-331

Con el fin de evaluar la eficiencia de los métodos de disrupción celular, se determinó el Nitrógeno Amino Libre (FAN) y el de Nitrógeno Total (TN) como análisis confirmatorios para determinar cuál método de hidrólisis registra mayor cantidad de nitrógeno que podría ser aprovechado en el proceso fermentativo.

En las tablas 8, 9, 10 y 11 se logra apreciar el porcentaje de rendimiento, acompañado del número de MLH y de los respectivos valores de FAN y TN.

Tabla 8 . Ensayo final por termólisis en tanque R-301 con crema del S-331

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL	FAN	TN
5	0 h	F5	100	550	1380	1930	123 ppm	0,07 %
	20 mn	F5	100	0	1880	1880		
	40 mn	F5	100	0	1810	1810		
	60 mn	F5	100	0	1780	1780		
	80 mn	F5	100	0	1650	1650		
	100 mn	F5	100	0	1400	1400		
	120 mn	F5	100	0	1230	1230		
	140 mn	F5	100	0	1260	1260		
	160 mn	F5	100	0	1220	1220	370 ppm	0,19 %
%R				MLH				
36,7875648				710				

Tabla 9. Réplica del ensayo final por termólisis en tanque R-301 con crema del S-331

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL	FAN	TN
6	0 h	F6	100	700	1430	2130	143 ppm	0,08 %
	20 mn	F6	100	0	2020	2020		
	40 mn	F6	100	0	1960	1960		
	60 mn	F6	100	0	1790	1790		
	80 mn	F6	100	0	1580	1580		
	100 mn	F6	100	0	1430	1430		
	120 mn	F6	100	0	1450	1450		
	140 mn	F6	100	0	1420	1420	406 ppm	0,19 %

%R	MLH
33,3333333	710

Ambas réplicas con termólisis de las tablas 8 y 9 muestran similitud en el % R entre los valores de 33 y 36. Contrastando así, con el número de MLH donde ambos suelen ser iguales.

En la determinación de FAN y TN ambas replicas arrojan un aumento desde la toma de muestra antes del proceso y el después del tratamiento.

Tabla 10. Ensayo final por plasmólisis en tanque R-301 con crema del S-331

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL	FAN	TN
7	0 h	F7	50	910	2550	3460	218 ppm	0,11 %
	1h	F7	50	0	2820	2820		
	2h	F7	50	0	2789	2789		
	4 h	F7	50	0	2110	2110	225 ppm	0,12 %
	6 h	F7	50	0	1980	1980		
			%R	MLH				
			42,7745665	1480				

Tabla 11. Réplica del ensayo final por plasmólisis en tanque R-301 con crema del S-331

ENSAYO	HORA	MUESTRA	T°	VIVAS	MUERTAS	TOTAL	FAN	TN
8	0 h	F8	50	480	2950	3430	68,2 ppm	0,10 %
	1h	F8	50	330	2220	2550		
	2h	F8	50	380	1750	2130		
	4h	F8	50	50	2110	2160	200 ppm	0,11 %
	6 h	F8	50	0	1990	1990		
			%R	MLH				
			41,9825073	1440				

En las tablas 10 y 11 ambas réplicas de plasmólisis no discriminaron datos del % R, igual que en el número de MLH siendo un rango de 1440 y 1480 millones de células. En la determinación de FAN y TN ambas replicas arrojan un aumento desde la toma de muestra antes del proceso y el después del tratamiento.

Para dar un aproximado de que tan eficaz es cada mecanismo de hidrólisis en cuanto al porcentaje de rendimiento se hizo un análisis de grafico de dispersión (ver grafica 1) donde se compara todas las etapas de la metodología planteada.

Tabla 12. Tabulación de porcentajes de rendimientos de levadura hidrolizada obtenidos en cada etapa según su método de disrupción celular.

	ETAPAS DEL PROCESO		
	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3
Termólisis	17,0648464%	47,8813559%	35,0604491%
Plasmólisis	84,5930233%	52,6066351%	42,3785369%

NOTA: Para obtener un solo %R en la etapa 3, se hizo un promedio de las dos replicas ensayadas en cada método de hidrolisis.

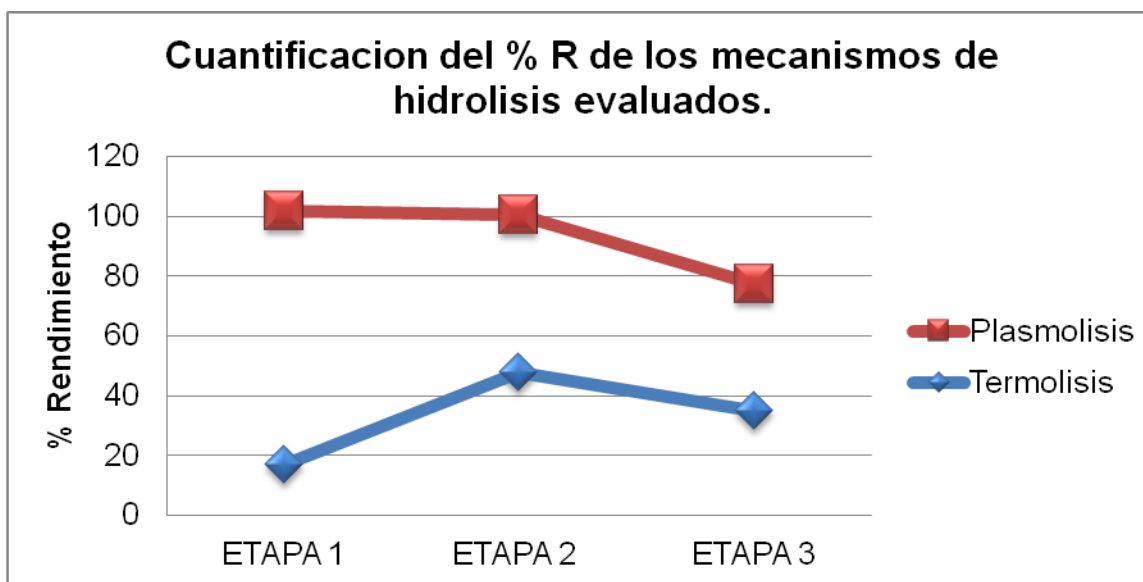


Figura 4. Comparación del porcentaje de rendimiento de la levadura hidrolizada (%R) de los mecanismos de hidrolisis evaluados durante la metodología experimental

En las tres etapas el porcentaje de rendimiento es mayor para el tratamiento con plasmólisis (Línea roja).

Tabla 13. Porcentajes de FAN para cada método de hidrolisis de la etapa 3.

	Mecanismos de disrupción celular			
	T1	T2	P1	P2
ANTES	123 ppm	143 ppm	225 ppm	68,2 ppm
DESPUES	370 ppm	406 ppm	218 ppm	200 ppm

Donde T1 (Primera réplica de termólisis), T2 (Segunda replica de termólisis), P1 (Primera réplica de Plasmólisis) y P2 (Segunda replica de plasmólisis).

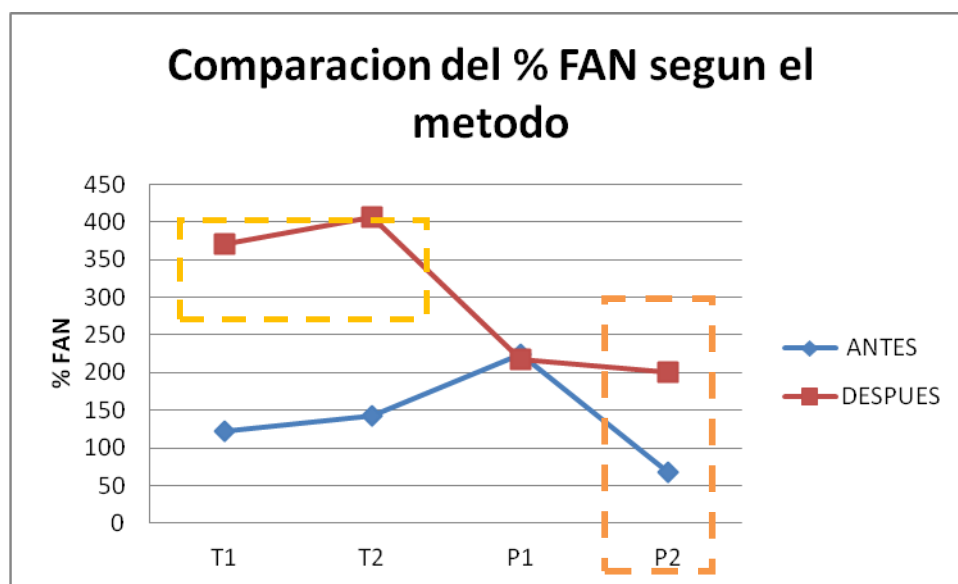


Figura 5. Comparación del porcentaje de FAN según el método de disrupción celular.

En la tabla 13 como en la figura 5 mostraron que el porcentaje de FAN de los ensayos por termólisis (T1 y T2) fueron más altos después del tratamiento con respecto a los valores obtenidos en plasmólisis (franja amarilla). En P1 y P2 los valores del antes difieren en ambas replicas, para P1 el porcentaje de FAN del antes y después del tratamiento fueron muy similares. En el antes del proceso, P2 genero un dato no confiable de 68.2 ppm con respecto a la réplica P1 el cual fue de 225 ppm (franja naranja).

10.2 Análisis estadístico por prueba paramétrica: ANOVA

Los datos fueron tabulados por el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI*. El análisis realizado para cada método de hidrólisis se presenta a continuación y se tomó como parámetros para la selección: el % de nitrógeno total antes y después de cada tratamiento.

Tabla 14. Resumen Estadístico

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Plasmólisis A	2	0,105	0,00707107	6,73435%	0,1	0,11	0,01
Plasmólisis D	2	0,12	0,0	0,0%	0,12	0,12	0,0
Termólisis A	2	0,075	0,00707107	9,42809%	0,07	0,08	0,01
Termólisis D	2	0,19	0,0	0,0%	0,19	0,19	0,0
Total	8	0,1225	0,0452769	36,9608%	0,07	0,19	0,12

Donde; Plasmolisis A: Es el antes del tratamiento con Plasmolisis, Plasmolisis D: Es el después del tratamiento con Plasmolisis, Termolisis A: Es el antes del tratamiento con Termolisis, Termolisis D: Es el después del tratamiento con Termolisis

Esta tabla muestra varios estadísticos para cada una de las 4 columnas de datos. Hay una diferencia de más de 3 a 1 entre la desviación estándar más pequeña y la más grande. Esto puede causar problemas puesto que el análisis de varianza asume que las desviaciones estándar de todos los niveles es igual.

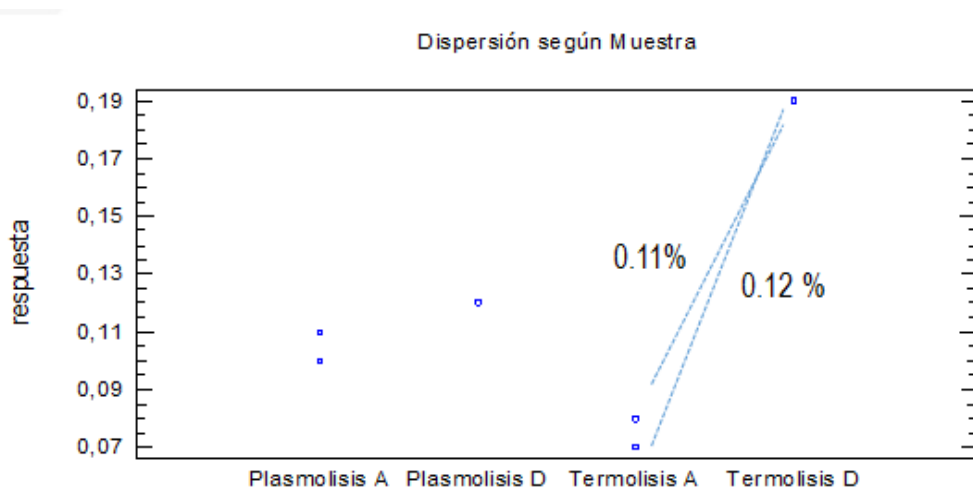


Figura 6. Gráfico de dispersión del incremento en términos de Nitrógeno.

*Donde; Plasmolisis A: Es el antes del tratamiento con Plasmolisis, Plasmolisis D: Es el después del tratamiento con Plasmolisis, Termolisis A: Es el antes del tratamiento con Termolisis, Termolisis D: Es el después del tratamiento con Termolisis

Tabla 15 . Incremento porcentual en término de nitrógeno total

FACTOR	Termólisis A	Termólisis D	Plasmólisis A	Plasmólisis D
Antes	0.07%	0.08%	0.11%	0.10%
Después	0.19%	0.19%	0.12%	0.12%
INCREMENTO	0.12 %	0.11%	0.01%	0.02%

*Donde, A: Antes del tratamiento y D: después del tratamiento.

Según el gráfico de dispersión el método de termólisis arroja un incremento favorable del antes al después del proceso, para termólisis A fue de un 0,12 % y para Termólisis D fue 0.11% en términos de porcentaje de Nitrógeno total (Franja azul), cosa que no se logra apreciar por el método de plasmólisis, los datos son casi idénticos y su incremento fue mínimo de 0,01 y 0,02 respectivamente.

Por ello, se hizo una verificación de varianza para ejecutar una prueba estadística formal para la diferencia entre las sigmas.

Tabla 16. Verificación de Varianza

Prueba		Valor-P
Levene's	3,46153E29	0,0

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 4 columnas son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

Para probar diferencias significativas entre las medias de las columnas, se hace un análisis de ANOVA.

Tabla 17 . Análisis de ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,01425	3	0,00475	190,00	0,0001
Intra grupos	0,0001	4	0,000025		
Total (Corr.)	0,01435	7			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos.

La razón-F, que en este caso es igual a 190,0, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó con unas pruebas de Múltiples Rangos.

Tabla 18 . Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Termólisis A	2	0,075	X
Plasmólisis A	2	0,105	X
Plasmólisis D	2	0,12	X
Termólisis D	2	0,19	X

Tabla 19 . Contraste múltiple de muestras.

Comparación múltiple	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Plasmólisis A - Plasmólisis D	*	-0,015	0,0138823
Plasmólisis A - Termólisis A	*	0,03	0,0138823
Plasmólisis A - Termólisis D	*	-0,085	0,0138823
Plasmólisis D - Termólisis A	*	0,045	0,0138823
Plasmólisis D - Termólisis D	*	-0,07	0,0138823
Termólisis A - Termólisis D	*	-0,115	0,0138823

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

En la parte superior, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (ver figura 7). Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

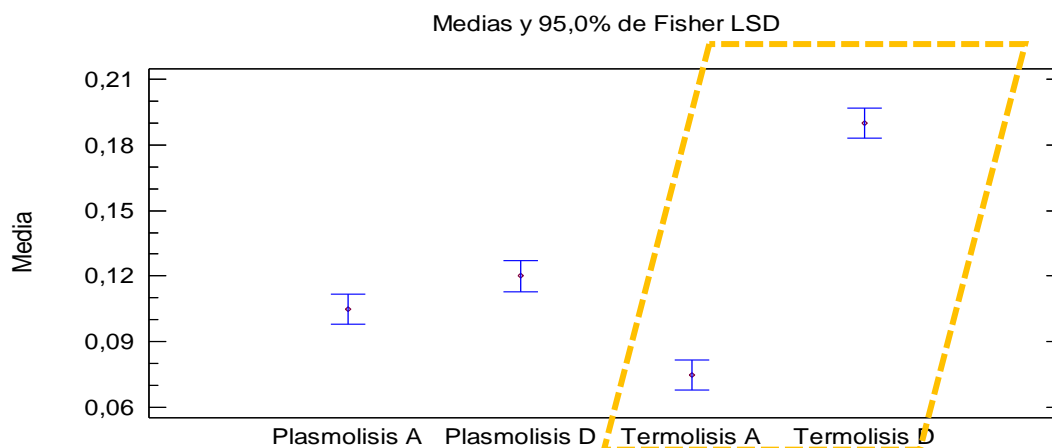


Figura 7. Gráfico de Fisher LSD.

La dispersión de los datos por Fisher y la dispersión de la figura 6 es idéntica donde el método de termólisis arroja un incremento favorable del antes al después del proceso en términos de porcentaje de Nitrógeno total (Franca amarilla), cosa que no se logra apreciar por el método de plasmólisis, los datos son similares entre sí.

11. ANALISIS DE RESULTADOS

Este proyecto fue elaborado con base en la búsqueda de un autosostenimiento a nivel de nutrientes, en el proceso de fermentación, siendo un estudio exploratorio, cuantitativo y experimental, que tuvo como finalidad el evaluar dos métodos de hidrólisis por termólisis y plasmólisis de la levadura residual GRXII para obtener extracto líquido con un alto grado de nitrógeno orgánico con el fin de llegar a reemplazar la dosificación de urea en el proceso fermentativo en la Destilería de INCAUCA S.A.S.

Durante los últimos 20 años, varios estudios han demostrado que el nitrógeno tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y la actividad fermentativa de la levadura. También se ha demostrado la existencia de una correlación entre la máxima velocidad de fermentación, el crecimiento de las levaduras y la concentración inicial de nitrógeno en el mosto.³

Si hay un déficit de nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA) en el mosto aumenta considerablemente el riesgo de paradas o ralentizaciones de la fermentación. De hecho, el déficit de nitrógeno en el mosto reduce la eficacia del crecimiento de las levaduras y por consiguiente, reduce la velocidad de fermentación.⁴ Por lo que es necesaria la búsqueda constante de nuevas formas de sostener los procesos biotecnológicos de forma sostenible.

Con respecto a la metodología planteada para este proyecto se hizo necesario el escalamiento por medio de etapas que permitieran conocer datos preliminares, para tomar decisiones respecto a los procedimientos con el fin de cumplir con nuestros objetivos dentro del plan de trabajo del proyecto.

El porcentaje de rendimiento fue uno de los factores evaluados, este se determinó con base en los datos de recuentos de levadura en cámara Neubauer. La primera etapa fue llamada línea base experimental debido a que fue el punto de partida donde se quiso ratificar que una hidrólisis es efectiva cuando las células se encuentran vivas y en su mejor estado fisiológico. Sirviendo como un referente teórico por lo que fue enriquecedor emprender nuestro proyecto con levadura activa del propagador 305. Aunque los valores que se obtuvieron del porcentaje de rendimiento para el método de termólisis no fue el esperado dejando claro que para este tipo de muestra es mejor emplear la técnica de plasmólisis como método de ruptura celular esto debido a que el %R de levadura hidrolizada fue 84.5 respecto a termólisis que arrojó un valor de 17.

³ <https://www.researchgate.net/publication/267388607>

⁴ <https://www.researchgate.net/publication/267388607>

En la segunda etapa del proceso, en donde se emplea levadura reciclada en cuya corriente hay más levadura muerta que viva, se fortalece la hipótesis de que es mejor hidrolizar levadura por medio de la técnica de plasmólisis según se muestra en (figura 4). Debido a que teóricamente una célula debe estar viva para hacer mecanismos de transporte de sustancias por consiguiente es capaz de sufrir fenómeno de plasmólisis debido al cambio brusco en las condiciones de membrana en cuanto a la pérdida de agua y turgencia celular (Ludwig, 1964).

En estas muestras el %R alcanzo valores de 47.8 y 52.6 para termólisis y plasmólisis respectivamente (ver tabla 12), En esta etapa el rendimiento de termólisis incremento sustancialmente, la principal diferencia entre estas 2 ensayos es el número de levadura viva. Estos datos no son congruentes puesto que se esperaría que a mayor número de levadura viva mayor sea el porcentaje de rendimiento.

Teniendo en cuenta que en la etapa 2, la crema usada tenía más cantidad de levadura muerta, los resultados evidencian que una parte de células no vivas también es hidrolizado, esto acorde a los recuentos en cámara. Al realizar los conteos fue común ver que las levaduras vivas morían rápidamente casi de forma instantánea, generalmente en el segundo conteo no se evidencio levadura viva en la mayoría de los ensayos, en adelante la disminución celular se registraba en la levadura muerta. Entonces, la condición viabilidad celular no fue una limitante para la hidrólisis, como si pudo serlo la temperatura, lo cual se evidencio en la etapa 3 del ensayo.

En la etapa 3, los rendimientos para plasmólisis continuaron arrojando los valores más altos, frente a la termólisis, (42% y 35% respectivamente); en esta fase se determinó la concentración de nitrógeno antes y después de la hidrólisis con el fin de correlacionar estos valores con el %R de levadura hidrolizada. Sin embargo los datos permitieron afirmar que estos parámetros no tienen directa relación.

El %R registra un más alto margen de error dada la forma en la que se realiza el conteo celular, según el protocolo que se siguió en el cual se pesan y aforan las muestras, esto abre la posibilidad de errores de tipo humano. Las etapas 1 y 2 permitieron predecir erróneamente que la técnica donde se tenía mejor rendimiento fue la plasmólisis (ver figura 4), pero con la realización de la etapa final del proceso, se deroga dicha afirmación.

Los análisis de FAN y %TN reflejan el resultado definitivo de la efectividad de cada hidrólisis, pues el interés real de la disrupción celular es obtener la mayor cantidad de nitrógeno para posterior uso como nutriente.

Los datos en términos de FAN (figura 5) de los ensayos del método de termólisis (T1 y T2) muestran valores más altos respecto a los valores obtenidos en plasmólisis. En P1 y P2 los valores del antes difieren, condición irregular dado que los parámetros de montaje del ensayo fueron idénticos, y el contenido celular inicial fue muy similar, se esperaría entonces datos parecidos en ambos replicas. Se considera que en P2 hubo un error de laboratorio y por ende la FAN se registró tan baja.

Los valores después de la plasmólisis son similares entre sí para los 2 ensayos, sin embargo para P1 el dato es ligeramente menor al valor arrojado al inicio de la hidrólisis por lo tanto se afirma que no hubo incremento o dado el caso fue muy mínimo. Estas discrepancias, ocurridas con la FAN de P1 y P2 pueden resultar del cambio de analista químico en el laboratorio fisicoquímico de la Destilería.

El porcentaje de nitrógeno orgánico reafirma los resultados finales de FAN para cada ensayo tanto de termólisis como plasmólisis, en el caso de la termólisis hubo un incremento de 0.12% y 0.11% para T1 y T2, comparado con un incremento de 0.01% y 0.02% arrojado en la plasmólisis (ver tabla 15). En esta etapa final del ensayo se registró un comportamiento atípico respecto al comportamiento de la plasmólisis en la etapa 1 y 2.

En las etapas iniciales no hubo determinación de nitrógeno, solo se asumió que a medida que incrementa la hidrólisis de levadura debería incrementar el contenido de nitrógeno en la muestra, sin embargo en la etapa 3 el mejor comportamiento a nivel de obtención de nitrógeno lo evidencio la termólisis celular, por el contrario plasmólisis tuvo un buen %R pero la obtención de nitrógeno total fue mínima, esto podría estar relacionado con los problemas de temperatura que se registraron los días de los ensayos de plasmólisis, en donde obtener los 50°C ocupó más tiempo y la temperatura a lo largo del ensayo fluctuó cayendo a valores de 40°C en varios momentos.

Acorde al análisis estadístico elaborado para el porcentaje de Nitrógeno total, se pudo interpretar con el software Statgraphics Centurion XVI permitiendo ver la dispersión de los datos y verificar la confiabilidad del estudio.

Cuando se hace comparaciones de datos cuantitativos entre más de dos grupos se utiliza el denominado Análisis de la Varianza (ANOVA). Este evalúa la posible igualdad de medias de una variable cuantitativa entre varias muestras sin aumentar la tasa de error tipo I (resuelve el problema de las múltiples comparaciones). El funcionamiento de ANOVA se basa en la descomposición de la variabilidad total de una variable en sus diferentes partes, la debida a las diferencias entre los grupos (efectos principales) y la debida a las diferencias entre los individuos de cada grupo (residuales) (Armitage P, 1994).

Los estudios experimentales que se obtuvieron con el análisis estadístico y análisis ofimáticos en presentaciones de gráfico y cálculo de Excel (ver figura 5) coincidieron con los valores en términos de FAN y %TN. Dando una aseveración del método más oportuno para obtener hidrolizado líquido con alto contenido de nitrógeno total siendo la termólisis el idóneo.

Se determinó por contraste de hipótesis que la hipótesis nula (H_0) es falsa o poco probable que se cumpla y que si hay diferencias significativas de un método al otro; puesto que al usar análisis paramétricos con variables independientes, permitió que los análisis fueran más determinativos como la verificación de varianza, por ANOVA. Estos admitieron que el valor-P fue menor que ($p < 0,05$) por lo que se establece que si existe diferencias estadísticamente significativas entre los métodos con un nivel de confianza del 95% (ver tabla 15 y 16). Oprimiendo así, la H_0 $T = P$ y dando paso a la hipótesis alternativa (H_a): La extracción de nitrógeno total obtenida con el método de termólisis (T) si difiere positivamente del obtenido de la extracción por plasmólisis (P): H_a $T \neq P$.

Al ser cero el valor de las diferencias significativas de las varianzas y medias aritméticas, convierte al análisis poco confiable. Por lo cual, se debe recomendar el empleo de más réplicas. Sin embargo los resultados obtenidos de FAN y %TN fueron muy bajos, no lograron ser discriminatorios unos de otros, se esperaba que fueran valores porcentuales más altos y con mayor significancia para emplear en futuros proyectos.

Al ser termólisis el método de disrupción celular más competente para la extracción de nitrógeno total de levadura, hizo justificable que: a nivel económico es barato en costos operacionales, hace al proceso amigable con el medio ambiente, es simple y seguro de emplear. Convirtiendo al proceso mucho más sostenible dando un giro en el uso integral de levadura reciclada de las fermentaciones.

12. CONCLUSIONES

El procedimiento desarrollado permitió evaluar y predecir satisfactoriamente que la levadura reciclada puede ser una buena fuente de nitrógeno si se usa el método adecuado, logrando sustituir fuentes de nitrógeno complejas como la urea. En este caso el que mejor rendimiento tuvo fue el método por termólisis, sin embargo existen muchos otros mecanismos de disrupción celular que permitan obtener mayores porcentajes de rendimiento y efectividad para lograr remplazar este nutriente.

A pesar de los problemas acarreados en el método por plasmólisis, no es apropiado decir que este método sea ineficiente, solo que al presentarse esos problemas al final del proceso fue difícil determinar su grado de importancia en cuando al incremento de nitrógeno total.

Ante las posibles ventajas del método se encontró que, logra ser efectivo, sostenible y ahorrador en costos operacionales, dando respuesta a la formulación del problema del proyecto y cumpliendo cada uno de los objetivos planteados.

La cuantificación del porcentaje de rendimiento de levadura hidrolizada en término de conteo en cámara fue desconcertante, puesto que no es un referente idóneo debido a los posibles márgenes de error que se obtuvieron dada la forma en la que se realiza el conteo celular, durante el proceso de extracción y del mismo montaje de muestras siendo esto errores de tipo humano.

La determinación del incremento porcentual de nitrógeno total para ambos tratamientos permitió redefinir que método fue óptimo para la obtención de nitrógeno total de hidrolizados líquidos. Dicho incremento solo favoreció a la termólisis debido a las fluctuaciones de temperatura que acarreo la plasmólisis por el mal estado del vapor que entro esos días a la Destilería.

13. RECOMENDACIONES

Debido a la promisorio capacidad del método de termólisis y potencial de extracción de nitrógeno total de la levadura GRX II en estudio, se hace necesaria la realización de estudios complementarios como:

Estudiar el metabolismo nitrogenado de la cepa especialmente en lo referente al crecimiento celular y la actividad de fermentación, así como la producción de metabolitos. Poniendo a la cepa a prueba con ensayos a escala de laboratorio, midiendo la funcionalidad y eficiencia del extracto de nitrógeno total obtenido con un extracto de levadura rico en fuentes de nitrógeno de tipo comercial.

En la realización de nuevos ensayos es necesario el uso de una sola técnica o método que pueda discernir cualquier contra tiempo y reabastecer variables sin márgenes de error, como modificación al reactor para lograr llevar un seguimiento más amplio a los factores físicos y químicos como (temperatura, aire, agua, nivel).

Implementar un mayor número de réplica, con el fin de obtener un análisis estadístico más confiables y determinativo. Luego de conocer la eficacia del producto proceder a una purificación y esterilización.

14. GLOSARIO

Autolisis: Es el proceso de autodestrucción celular que conduce a la degradación.

Biomasa: Es aquella materia orgánica de origen vegetal o animal incluyendo los residuos y desechos orgánicos, susceptible de ser aprovechada energéticamente.

Biopreparado: Es una combinación o mezcla de sustancias que tienen propiedades significativas para comenzar un ensayo.

Bioproducto: son el resultado de la aplicación de biotecnología, dentro del ámbito industrial, donde mediante procesos biológicos, bioquímicos, físicos, térmicos de fermentación, Esterificaciones, se transforma la biomasa.

Biosintetizar: Es el proceso de obtener un compuesto o producto mediante la síntesis.

Disrupción: Proceso que crea una ruptura brusca o no.

Flemazas: Son las impurezas volátiles que contaminan el etanol.

Hidrolizado: Subproducto de una hidrolisis de un compuesto orgánico que ha sido descompuesto en sus elementos químicos mediante la adición de agua.

Levadura GRX II: Levadura del genero *Saccharomyces* adaptada a procesos de fermentación de INCAUCA S.A.S.

Lisis: Destrucción o desintegración de un elemento orgánico como celular o bacterias.

Poliaminas: son moléculas de tamaño pequeño, derivadas metabólicamente de ciertos aminoácidos, con un tamaño parecido al de ellos

Subproducto: Es un residuo de un proceso que se le puede sacar una segunda utilidad. No es un desecho por que no se elimina, y se usa para otro proceso distinto.

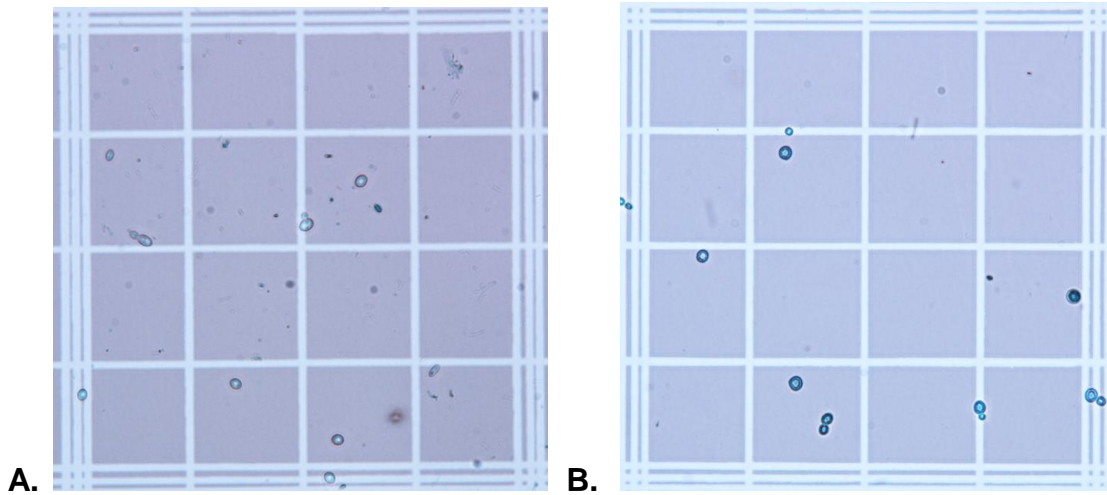
15. BIBLIOGRAFÍA

- Armitage P, B. G. (1994). *Statistical Methods in Medical* (3rd ed.). Oxford: Oxford: Blackwell scientific.
- Balasundaram, B.; Harrison, S.; Bracewell, DG (2009). Avances en estrategias de liberacion de productos e impacto en el diseño de bioprocesos. *Tendencias en Biotecnología* pag 477-485
- Boulton, R. B. (2013). *Principles and practices of winemaking: Nitrogen Metabolism During Fermentation*. New York: Springer Science & Business Media.
- Fajardo, Erika., & Sarmiento, Sandra. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogota D.C.
- Figuroa, M., & Villegas, A. (2012). *Tecnologías de proceso de secado de levadura por empresas Brasileñas USINA NARDINI y USINA JARDEST.* . Brazil.
- García Vezga, Anaisabel. (2004). Estudio del impacto de la descarga de levadura sobre la planta de tratamiento de aguas residuales de cervecería polar los cortijos y presentación de alternativas para su manejo directo. Universidad metropolitana, Caracas.
- Gonzalez Castañon, M. J. (2009). *Efecto de la adición de hidrolizados de levadura Saccharomyces cerevisiae en la obtención de leches acidificadas*. Chile.
- Gonzalez Rojas, A. (2000). *Nitrogeno facilmente aprovechable para las levaduras*. Santiago de Chile.
- Lezcano, E. (2012). Cadena de la levadura. *Alimentos argentinos*, 1-29.
- Ludwig, M. (1964). Manual de laboratorio de fisiología. Turrialba, Costa rica: SIC.
- Otero, M. A., & Cabello, A. J. (2007). Procesamiento de levadura para la obtención de derivados. Diferentes alternativas. *ICIDCA*, *XLI*(1), 2-11.
- Otero, M. A., & Cabello, A. J. (2010). Obtención de extracto de levadura a partir de residuo de extracción alcalina de ácido ribonucleico de *Candida utilis*. *ICIDCA*, *44*(2), 16-20.

- Otero, M., Cabello, A., Vasallo, M. C., García, L., & López, J. (2000). Tecnología para la utilización integral de la levadura de cerveza en la industria alimenticia. *ALAN*, 50(4), 361-365.
- Pimienta Lastra, R. (2000). Pruebas probabilísticas vs no probabilísticas. *Redalyc*(13), 263-276.
- Praj. (2004). *Metodos analiticos para los procesos de fermentacion y Destilacion a partir de materias primas provenientes de la caña*. (4 ed., Vols. A-B-C-D-E-I-J-K-L). India: Praj Industries.
- Praj. (2004). *Metodos analiticos para los procesos de fermentacion y Destilacion a partir de materias primas provenientes de la caña* (4 ed., Vol. Fy J2). India: Praj Industries.
- Rendimiento de la fermentacion con un nutriente 100% organico*. visto en la pagina <https://www.researchgate.net/publication/267388607>. (acceso Mayo 19, 2017)
- Salari Roshanak, Sedigheh BiBi, Rajabi Omid & Khashyarmanesh Zahra (2013). New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21:73 pag 1-9
- Serrano, P., Brizuela, M. A., Tejeda, G., Rodríguez, R., Iglesias, I., & Legrá. (2005). Hidrolizado básico de levadura y su aplicación en la obtención de biopreparados. *ICIDCA*. , vol. XXXIX(1), pp. 3-9.
- Serrano, P., Brizuela, M., & Rodríguez, R. y. (1994). Optimización del Hidrolizado de Levadura como fuente de nitrógeno para la producción de BIOICIL. *Trabajo presentado al IX Forum de Ciencia y tecnología*.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA*., vol. 50(1), pp. 20-28.
- Stowers, C; Boczko, E. (2007). Reliable cell disruption in yeast. Department of Chemical Engineering, Vanderbilt University, John Wiley & Sons, Ltd. Pag 533-541
- Vasallo, M. C., Otero, M. A., Garcia, L., Dopico, J. R., & Lopez, J. C. (2001). Effect of homogenization as pretreatment for the improvement of autolysis efficiency of *Kluyveromyces fragilis*. *Food Science & Technology International* , 7(5): 445-450.

16. ANEXOS

Anexo 1. Recuentos fotográficos de la levadura del R-305 antes y luego de la hidrólisis. A. Conteo antes del tratamiento (Levadura vivas); B. Conteo después del tratamiento (levadura muerta). Objetivo 40X



Anexo 2. Recuentos fotográficos de la levadura del S-331 antes y luego de la hidrólisis. A. Conteo antes del tratamiento (Levadura vivas + muertas); B. Conteo después del tratamiento (levadura muerta). Objetivo 40X

