

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ingeniería**



**Evaluación de métodos de lisis celular para la obtención de extracto de levadura a partir de *Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo de graduación presentado por Natalia Alejandra Díaz Cárdenas  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala

2024



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ingeniería**



**Evaluación de métodos de lisis celular para la obtención de extracto de levadura a partir de *Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo de graduación presentado por Natalia Alejandra Díaz Cárdenas para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala

2024

Vo. Bo.

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez


Terna examinadora

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez

(f) 

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

(f) 

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 12 de diciembre de 2024

## PREFACIO

El tema de este trabajo de graduación surge a partir de mi interés en la reutilización de compuestos residuales en industrias grandes como la azucarera y producción de bebidas alcohólicas. A lo largo de mi carrera universitaria, aprendí acerca del potencial que tiene la biotecnología en tomar los residuos de una industria para un nuevo proceso y obtención de productos de valor. Además, al conocer y estudiar sobre la amplia gama de aplicaciones de las levaduras, me llamó la atención la producción del extracto de levadura y el potencial que este producto tiene en la industria. Mi interés por el área de bioprocesos, me llevó a investigar sobre técnicas de ruptura celular para la obtención del extracto de levadura, como forma de mejorar la efectividad de producción de compuestos de alto valor biológico.

Agradezco profundamente a mis padres Ing. Alejandro Díaz e Ing. M.A. Solimar Cárdenas, por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica. Por supuesto, por el gran ejemplo que han sido para mí, siendo siempre un pilar fundamental en mi formación personal y académica. Por siempre creer en mí y alentarme a dar mi mejor versión para siempre alcanzar mis metas.

A mis hermanos menores Adriana y Christian por siempre motivarme a darles mejor ejemplo y su cariño hacia mí. Por sus palabras de ánimo y reconocimiento de mi esfuerzo.

Agradezco a mi asesor Ing. MBA & M. Sc Luis Núñez, por su apoyo y enseñanzas no solo durante esta etapa sino toda mi carrera, así como a nuestro director de carrera Ing. M. Sc. Gamaliel Zambrano, por su orientación y motivación a lo largo de mi carrera. A mi catedrático, Lic. Carlo Martínez, por sus palabras de aliento y orientación durante mi experimentación del presente trabajo. A los técnicos del Laboratorio de Operaciones Unitarias, Christian, Héctor y José, por su apoyo durante la experimentación de esta investigación.

# ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	2
III.	Justificación.....	4
IV.	Objetivos.....	6
A.	General.....	6
B.	Específicos.....	6
V.	Marco teórico.....	7
C.	Levaduras.....	7
D.	Crecimiento de levaduras.....	8
E.	Fases de crecimiento de levaduras.....	10
F.	Viabilidad de levaduras.....	13
G.	Lisis celular.....	15
H.	Métodos de lisis celular.....	17
I.	Extracto de levadura.....	19
J.	Obtención de extracto de levadura.....	20
K.	Equipos involucrados.....	21
VI.	Metodología.....	25
A.	Preparación de medios de cultivo.....	25
B.	Aislamiento de cepa de levadura.....	25
C.	Propagación de células de levadura.....	26
D.	Propagación en reactor.....	28
E.	Estudio de viabilidad celular.....	29
F.	Curvas de crecimiento.....	30
G.	Métodos de lisis.....	31

a.	Cambios de temperatura .....	31
b.	Hidrólisis ácida y mecánica .....	32
c.	Lisis mecánica .....	33
d.	Recuperación de biomasa .....	34
e.	Obtención del extracto de levadura .....	35
f.	Cuantificación de nitrógeno total .....	35
VII.	Resultados.....	38
A.	Crecimiento de la levadura.....	38
B.	Lisis por cambios de temperatura.....	42
C.	Lisis mecánica .....	46
D.	Hidrólisis ácida.....	47
E.	Hidrólisis básica .....	50
F.	Extracto de levadura final.....	54
VIII.	Discusión de resultados .....	55
IX.	Conclusiones.....	65
X.	Recomendaciones .....	66
XI.	Referencias .....	67
XII.	Anexos .....	71
G.	Datos originales .....	71
H.	Datos calculados .....	87
I.	Análisis estadístico .....	98
J.	Glosario .....	120

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Datos de concentración y sustrato de las levaduras en la curva de crecimiento	38
<b>Cuadro 2.</b> Concentraciones iniciales y finales durante proceso de propagación de biomasa, con valores respectivos de etanol .....	41
<b>Cuadro 3.</b> Resumen estadístico de métodos de lisis.....	53
<b>Cuadro 4.</b> Extracto de levadura obtenido .....	54
<b>Cuadro 5.</b> Datos de conteo celular en cámara de Neubauer y consumo de sustrato durante la curva de crecimiento realizada .....	71
<b>Cuadro 6.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis acida a 0.5 M .....	71
<b>Cuadro 7.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis acida a 0.5 M.....	72
<b>Cuadro 8.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis acida a 0.5 M.....	72
<b>Cuadro 9.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis acida a 1 M .....	73
<b>Cuadro 10.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis acida a 1 M.....	73
<b>Cuadro 11.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis acida a 1M.....	73
<b>Cuadro 12.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis acida a 1.5 M .....	74
<b>Cuadro 13.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis acida a 1.5 M.....	74
<b>Cuadro 14.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis acida a 1.5 M.....	75
<b>Cuadro 15.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis básica a 0.5 M.....	75

<b>Cuadro 16.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 0.5 M .....	76
<b>Cuadro 17.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis básica a 0.5 M .....	76
<b>Cuadro 18.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis básica a 1 M.....	77
<b>Cuadro 19.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 1 M .....	77
<b>Cuadro 20.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis básica a 1 M .....	77
<b>Cuadro 21.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis básica a 1.5 M.....	78
<b>Cuadro 22.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 1.5 M.....	78
<b>Cuadro 23.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 1.5 M .....	78
<b>Cuadro 24.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de lisis por cambios temperatura.....	79
<b>Cuadro 25.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de lisis por cambios temperatura .....	79
<b>Cuadro 26.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de lisis por cambios temperatura .....	80
<b>Cuadro 27.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de lisis por temperatura de ebullición del agua .....	80
<b>Cuadro 28.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de lisis por temperatura de ebullición del agua .....	81
<b>Cuadro 29.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de lisis por temperatura de ebullición del agua .....	81
<b>Cuadro 30.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de lisis por lisis mecánica a 11000 rpm .....	81

<b>Cuadro 31.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de lisis por lisis mecánica a 11000 rpm.....	82
<b>Cuadro 32.</b> Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de lisis por lisis mecánica a 11000 rpm.....	82
<b>Cuadro 33.</b> Datos de placa de equipos utilizados.....	83
<b>Cuadro 34.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis ácida a 0.5 M .....	87
<b>Cuadro 35.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis ácida a 0.5 M .....	87
<b>Cuadro 36.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis ácida a 0.5 M.....	87
<b>Cuadro 37.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis ácida a 1 M .....	88
<b>Cuadro 38.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis ácida a 1 M .....	88
<b>Cuadro 39.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis ácida a 1 M.....	89
<b>Cuadro 40.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis ácida a 1.5 M .....	89
<b>Cuadro 41.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis ácida a 1.5 M .....	89
<b>Cuadro 42.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis ácida a 1.5 M.....	90
<b>Cuadro 43.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis básica a 0.5 M.....	90
<b>Cuadro 44.</b> Cálculos de viabilidad en la segunda repetición de hidrólisis básica a 0.5 M...	91
<b>Cuadro 45.</b> Cálculos de viabilidad en la tercera repetición de hidrólisis básica a 0.5 M....	91
<b>Cuadro 46.</b> Cálculos de viabilidad en la primera repetición de hidrólisis básica a 1 M .....	91
<b>Cuadro 47.</b> Cálculos de viabilidad en segunda repetición de la hidrólisis básica a 1 M.....	92

<b>Cuadro 48.</b> Cálculos de viabilidad en tercera repetición de la hidrólisis básica a 1 M.....	92
<b>Cuadro 49.</b> Cálculos de viabilidad en la primera repetición de hidrólisis básica a 1.5 M ..	92
<b>Cuadro 50.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis básica a 1.5 M.....	93
<b>Cuadro 51.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis básica a 1.5 M.....	93
<b>Cuadro 52.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición lisis por cambios de temperatura .....	94
<b>Cuadro 53.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición lisis por cambios de temperatura .....	94
<b>Cuadro 54.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición lisis por cambios de temperatura .....	95
<b>Cuadro 55.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua .....	95
<b>Cuadro 56.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua .....	95
<b>Cuadro 57.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua .....	96
<b>Cuadro 58.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición lisis mecánica a 11000 rpm.....	96
<b>Cuadro 59.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición lisis mecánica a 11000 rpm.....	96
<b>Cuadro 60.</b> Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición lisis mecánica a 11000 rpm.....	97
<b>Cuadro 61.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis ácida a 0.5 M.....	98
<b>Cuadro 62.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis ácida a 1 M .....	98

<b>Cuadro 63.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis ácida a 1 M .....	98
<b>Cuadro 64.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis básica 0.5 M.....	99
<b>Cuadro 65.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis básica 1 M .....	99
<b>Cuadro 66.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis básica 1.5 M.....	100
<b>Cuadro 67.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas la lisis por cambios de temperatura .....	100
<b>Cuadro 68.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas la lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua.....	101
<b>Cuadro 69.</b> Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas la lisis mecánica .....	101
<b>Cuadro 70.</b> Prueba de medias para los métodos estudiados después de dos minutos de exposición al método correspondiente para análisis estadístico determinado.....	101
<b>Cuadro 71.</b> Análisis de varianza a partir de la prueba de medias obtenida para los métodos de lisis realizados.....	102
<b>Cuadro 72.</b> Valor crítico en para prueba de Tukey .....	102
<b>Cuadro 73.</b> Diferencia de medias entre métodos para prueba de Tukey .....	103
<b>Cuadro 74.</b> Resultados de prueba de Tukey .....	103

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Levaduras .....	7
<b>Figura 2.</b> <i>Balance de masa teórico de fermentación</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento teórica de células .....	13
<b>Figura 4.</b> Muestra de levaduras en cámara de Neubauer para recuento de células viables y no viables.....	15
<b>Figura 5.</b> Partes de levadura .....	17
<b>Figura 6.</b> Extracto de levadura granulado.....	20
<b>Figura 7.</b> <i>Diagrama de flujo de fermentación industrial</i> .....	22
<b>Figura 8.</b> Biorreactor .....	23
<b>Figura 9.</b> Centrífuga industrial .....	24
<b>Figura 10 .</b> Concentración de células con respecto al tiempo .....	39
<b>Figura 11.</b> Concentración del sustrato con respecto al tiempo.....	40
<b>Figura 12.</b> Velocidad de reacción de propagación de levaduras .....	41
<b>Figura 13.</b> Viabilidad por cambios de temperatura en relación al tiempo.....	42
<b>Figura 14.</b> Viabilidad según temperatura del medio .....	43
<b>Figura 15.</b> Viabilidad según tiempo de ebullición.....	44
<b>Figura 16.</b> Viabilidad por temperatura de ebullición.....	45
<b>Figura 17.</b> Viabilidad según lisis mecánica.....	46
<b>Figura 18.</b> Viabilidad por hidrólisis ácida a 0.5 M.....	47
<b>Figura 19.</b> Viabilidad por hidrólisis ácida a 1 M.....	48
<b>Figura 20.</b> Viabilidad por hidrólisis ácida a 1.5 M.....	49
<b>Figura 21.</b> Viabilidad por hidrólisis básica a 0.5 M .....	50
<b>Figura 22.</b> Hidrólisis básica a 1 M .....	51

<b>Figura 23.</b> Hidrólisis básica a 1.5 M .....	52
<b>Figura 24.</b> <i>Balance de masa de fermentación en biorreactor</i> .....	104
<b>Figura 25.</b> <i>Balance de masa para sistema de lisis por cambios de temperatura</i> .....	104
<b>Figura 26.</b> Balance de masa para sistema de hidrólisis ácida.....	105
<b>Figura 27.</b> Balance de masa para sistema de hidrólisis básica .....	105
<b>Figura 28.</b> Balance de masa para lisis mecánica .....	105
<b>Figura 29.</b> Especificaciones de extracto de levadura para uso en laboratorio.....	108
<b>Figura 30.</b> <i>Placa de agar PDA de aislamiento de colonias de levadura</i> .....	108
<b>Figura 31.</b> <i>Tinción de Gram de cepa de levadura elegida</i> .....	109
<b>Figura 32.</b> Inóculo de levadura para volumen final.....	109
<b>Figura 33.</b> Medio de cultivo recién inoculado para propagación final.....	110
<b>Figura 34.</b> 80 L de medio fermentado para propagación de levadura.....	110
<b>Figura 35.</b> Pasta de levadura obtenida.....	111
<b>Figura 36.</b> Siembra de levaduras según concentración final en primera fase de propagación .....	111
<b>Figura 37.</b> Concentración final de inóculo de 4 L.....	112
<b>Figura 38.</b> Siembra de levaduras después de 1 y dos días de fermentación en reactor de 80 L .....	112
<b>Figura 39.</b> Sistema utilizado para lisis por cambios de temperatura .....	113
<b>Figura 40.</b> Sistema utilizado para hidrólisis ácida y básica.....	113
<b>Figura 41.</b> Sistema para conteo de viabilidad con cámara de Neubauer .....	114
<b>Figura 42.</b> Resultados de siembra de muestras de la primera repetición de lisis mecánica .....	114
<b>Figura 43.</b> Resultados de siembra de muestras de la segunda repetición de lisis mecánica .....	115

<b>Figura 44.</b> Resultados de primera repetición de lisis por cambios de temperatura .....	115
<b>Figura 45.</b> Resultados de segunda repetición de lisis por cambios de temperatura .....	116
<b>Figura 46.</b> Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 0.5 M .....	116
<b>Figura 47.</b> Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 1 M	117
<b>Figura 48.</b> Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 1.5 M .....	117
<b>Figura 49.</b> Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 1.5M con tiempos menores a 2 minutos y de la lisis por exposición de temperatura de ebullición. ..	118
<b>Figura 50.</b> Resultados de siembra de muestras para la hidrolisis ácida y básica en tiempos mayores a 10 minutos .....	118
<b>Figura 51.</b> Solución de extracto de levadura preparada para caracterización de nitrógeno total .....	119
<b>Figura 52.</b> Comparación colorimétrica de solución preparada con extracto de levadura (derecha) y blanco (izquierda) para análisis de nitrógeno total.....	119

## LISTADO DE CÁLCULOS

<b>Cálculo 1.</b> Concentración celular .....	85
<b>Cálculo 2.</b> Velocidad específica de crecimiento .....	85
<b>Cálculo 3.</b> Total de células.....	85
<b>Cálculo 4.</b> Viabilidad celular .....	86
<b>Cálculo 5.</b> Proteína en extracto de levadura.....	86
<b>Cálculo 6.</b> Media de viabilidad .....	106
<b>Cálculo 7.</b> Desviación estándar.....	106
<b>Cálculo 8.</b> Intervalo de confianza .....	106
<b>Cálculo 9.</b> Valor crítico para prueba de Tukey .....	106
<b>Cálculo 10.</b> Comparación de medias .....	107

## **RESUMEN**

El extracto de levadura es un producto de alto valor en el mercado, gracias a su amplia gama de aplicaciones de diversas industrias. Debido a que la materia prima de este producto es la levadura, existen una gran disponibilidad en la industria. Esto al considerar que, en la producción de etanol, bebidas alcohólicas, utilizan de este microorganismo para la obtención de su producto de interés y pueden llegar a producirse hasta 28mil toneladas por año de levadura residual. Por lo tanto, existe un gran potencial en la implementación de protocolos de obtención de extracto de levadura a partir de este subproducto de la industria.

En la presente investigación se estudiaron diferentes métodos de lisis celular, partiendo desde el crecimiento de una cepa de *S. cerevisiae* seleccionada. Se obtuvo una concentración de  $4.54 \cdot 10^{13} \pm 2.79 \cdot 10^{-1}$  g/g de células de levadura en el último paso de la propagación, con un volumen de 85 L. A partir de la levadura viable obtenida se realizaron pruebas de métodos de lisis celular. Luego de un análisis estadístico de prueba de varianza y prueba de Tukey, se determinaron los métodos con mayor y menor efectividad para llegar a una lisis completa de la levadura. Como método menos efectivo se determinó la lisis mecánica, en donde la viabilidad celular no bajo del 50 % en ninguna de las tres repeticiones realizadas con el método. Por el contrario, las hidrólisis ácida y básica realizadas con soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, respectivamente, en concentración de 1.5 M, demostraron ser las más efectivas en bajar la viabilidad. De igual manera, fueron los métodos que menor tiempo requirieron en llegar a una viabilidad del 0 %, alrededor de 2 minutos después del inicio de la reacción. Por último, se obtuvo una cantidad final de  $121.542 \pm 5 \cdot 10^{-5}$  g de extracto de levadura partiendo de alrededor de 10g de levadura seleccionada. Se realizó una caracterización de la proteína del producto final obtenido, en donde se realizó una medición del nitrógeno total en una solución realizada con el extracto. En esto, se obtuvo una concentración de  $5.15 \pm 5.24 \cdot 10^{-3}$  % m/m de nitrógeno total, equivalente a  $38.85 \pm 1.02 \cdot 10^{-2}$  % m/m de proteína en el producto final.

## **ABSTRACT**

Yeast extract is a high-value product in the market, due to its wide range of applications from various industries. Considering the raw material of this product is yeast, there is a great availability in the industry. Naturally, considering that in the production of ethanol, alcoholic beverages use this microorganism to obtain their product of interest and up to 28 thousand tons of residual yeast can be produced per year. Therefore, there is great potential in the implementation of protocols for obtaining yeast extract from this industry's subproduct.

In the present research, different methods of cell lysis were studied, starting from the growth of a selected strain of *S. cerevisiae*. A concentration of  $4.54 \cdot 10^{13} \pm 2.79 \cdot 10^{-1}$  g/g of yeast cells was obtained in the last step of the propagation process, with a volume of 85 L. From the viable yeast obtained, tests of cell lysis methods were carried out. After a statistical analysis of the test of variance and Tukey's test, the methods with the highest and least effectiveness to reach a complete lysis of the yeast were determined. Mechanical lysis was determined as the least effective method, where cell viability did not fall below 50 % in any of the three repetitions performed with the method. On the contrary, acid and basic hydrolysis performed with solutions of hydrochloric acid and sodium hydroxide, respectively, in a concentration of 1.5 M, proved to be the most effective in lowering viability. Of course, taking into account that they were the methods that required the least time to reach a viability of 0 %, around 2 minutes after the start of the reaction. Finally, a final amount of  $121,542 \pm 5 \cdot 10^{-5}$  g of yeast extract was obtained from about 10g of selected yeast. A characterization of the protein of the final product obtained was carried out, where a measurement of the total nitrogen in a solution made with the extract was performed. In this, a concentration of  $5.15 \pm 5.24 \cdot 10^{-3}$  % m/m of total nitrogen was obtained, equivalent to  $38.85 \pm 1.02 \cdot 10^{-2}$  % m/m of protein in the final product.

# I. INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una gran fuente de compuestos bioactivos, así como aminoácidos, minerales y vitaminas. Este microorganismo tiene diferentes aplicaciones en industrias como la alimentaria, farmacéutica e incluso en el campo de los biocombustibles. Esto se debe a su capacidad de fermentar azúcares, producir compuestos bioactivos e incluso, la biomasa ya utilizada tiene también un uso. Por lo mismo, luego de utilizar el producto para fermentaciones u otras aplicaciones microbiológicas, el residuo puede ser utilizado para crear un nuevo producto, específicamente el extracto de levadura.

El extracto de levadura se obtiene mediante la lisis celular de la levadura, es decir, la ruptura de la pared celular del microorganismo. En este proceso se liberan sus componentes intracelulares, lo cual puede resultar complejo. El extracto de levadura es considerado una gran fuente de proteínas, nutrientes y algunos minerales. Por lo tanto, es utilizado en industrias como la alimentaria y la microbiológica y es necesario implementar métodos estandarizados para su obtención. Entre los principales, se encuentra la lisis de la levadura por método de aumento de temperatura, así como cambios en el pH para llegar a la muerte celular. La eficiencia y calidad del extracto son dependientes del método de lisis utilizado para obtener el producto deseado. Por lo mismo, este trabajo se enfoca en el estudio de diferentes métodos de lisis de las levaduras, para determinar condiciones óptimas de esta operación.

En la evaluación de los métodos se determina la susceptibilidad de las levaduras a condiciones donde las levaduras no tienden a sobrevivir. Por lo tanto, se incluyen no solo, las curvas de crecimiento de estas levaduras, sino especialmente sus curvas de muerte. A partir de esto, se busca evaluar la eficiencia de los métodos, así como determinar las mejores condiciones para completar esta operación. Por supuesto, se buscan procesos que sean cortos en tiempo de operación, y eficientes en completar la lisis celular de la masa total tratada.

## II. ANTECEDENTES

En el artículo de Jacob, et. al. (2019) se estudia la producción de extracto de levadura a partir de levadura residual de la fabricación de cerveza. En este se evalúa la influencia de diferentes métodos de lisis celular aplicables a un nivel industrial. Los métodos evaluados se centran en el uso de un molino de células, sonótroda ultrasónica y un método de autólisis.

El método de disrupción mecánica se llevó a cabo utilizando un molino de células, con una frecuencia de agitación de 75 Hz. Se utilizó un volumen de 200 mL con bolas de vidrio con un diámetro de 0,5 mm con una relación de peso de 1:2. El molino mantuvo una temperatura de 7 °C, en donde la mezcla de agua- glicol a través de una chaqueta sobre el vaso. El procedimiento se completó después de 15 minutos, donde las células ya no eran viables después del proceso.

Por otra parte, en el artículo publicado por Zarei et al. (2016) se proporciona un protocolo simple y rápido de realizar para la producción de extracto de levadura a partir de *S. cerevisiae*, el cual es utilizado para la preparación de medios de cultivo, con este compuesto como fuente de nutrientes adicionales. Se realizaron pruebas de viabilidad del extracto obtenido mediante crecimiento bacteriano en medios de cultivo preparados con el extracto obtenido y otros nutrientes necesarios para el crecimiento. Se monitoreó el crecimiento de las bacterias con un medio de cultivo comercial como control. Así, se determinaron diferencias significativas en los crecimientos en ambos medios de cultivo.

El método de lisis por tratamiento térmico, se estudió por Palma et al. (2003) en donde se expusieron las células a temperaturas de 35 °C y 50 °C durante 15-30 horas. A partir de este método de lisis, se obtuvo un producto de extracto de levadura. Este contuvo una concentración de 20 g/L de proteínas y con pequeñas cantidades de ARN obtenidas por electroforesis en gel y espectrometría. Por otra parte, también se estudió la lisis por tratamiento autolítico, en una solución tamponada. Este método dio lugar a una mayor liberación de ARN intracelular, por lo que se determinó más eficiente para el fin del estudio presentado.

En el caso del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala, se tiene una producción constante de bioetanol, así como diferentes proyectos y demostraciones de fermentaciones a escala de plantas piloto. Por supuesto, para esto se utiliza levadura *S. cerevisiae*, la cual no tiene un uso posterior a la fermentación. En instancias anteriores, se ha buscado la forma de utilizar este subproducto en la universidad, mas no se ha presentado investigaciones al respecto. Esto mismo ocurre en las diferentes industrias, como el caso de los ingenios, producción de bebidas alcohólicas y otras industrias, en donde se tienen grandes producciones de levadura residual y no tienen una función posterior a la fermentación.

### III. JUSTIFICACIÓN

La obtención de productos como etanol, destilados y otras bebidas alcohólicas son de gran importancia en las diferentes industrias tanto en Guatemala como a nivel mundial. En este contexto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* juega un papel importante en obtener el etanol necesario para la obtención de estos productos. A pesar de esto, los residuos de la levadura ya utilizada para el proceso de fermentación generado pueden representar un problema para las industrias si no se tiene un protocolo de desecho o reutilización. En Guatemala, se estima una cantidad de 128,000 toneladas anuales de levadura residual producida. Actualmente, no fueron encontrados estudios publicados que aborden el uso de levaduras residuales para la producción de extracto de levadura a partir de estas (Santamaría, 2022).

El extracto de levadura es considerado un producto de alto valor en el mercado, debido a su amplia gama de aplicaciones dentro de la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica. La demanda del producto es alta y los precios son igualmente elevados, no solo específicamente en Guatemala, sino también en el resto del mundo. Por supuesto, dependiendo del uso que se le dé, es diferente el precio al que se ofrece en el mercado.

A pesar de que se tiene una gran disponibilidad de la materia prima y necesidad del producto, no se encontró un protocolo de producción para la obtención del extracto en Guatemala. Es por eso que, en este trabajo de graduación, se desarrolla una evaluación de cuatro diferentes métodos de lisis celular para obtener el extracto de levadura a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Se determinaron los métodos de cambios de temperatura, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y lisis mecánica para obtener el producto. Esto, con el fin de obtener una comparación entre los métodos elegidos y así determinar en qué condiciones existe un descenso en la viabilidad celular en un menor tiempo.

De igual manera, se encuentra que este producto puede representar un aumento en la rentabilidad de los procesos en donde se involucra el uso de esta levadura. Tomando en cuenta que el precio del extracto de levadura en el mercado internacional puede llegar a ser de hasta 20 \$/kg, sin llegar a un grado de laboratorio o alimenticio. Al llegar a un grado

laboratorio para su uso en microbiología, el precio puede llegar hasta Q3600.00 por kg del extracto. En la industria de alimentos, en donde puede variar la pureza del compuesto, el precio de venta de este producto puede alcanzar un precio de hasta Q300.00 por kg. Por lo tanto, la implementación de un proceso del cual se puedan generar mayores ingresos puede representar mejoras en la rentabilidad de los procesos industriales mencionados. Por esto, este trabajo busca sentar las bases para posteriores estudios que generen la posibilidad de aprovechar el potencial económico que este producto representa. (Merck, 2024)

## IV. OBJETIVOS

### A. General

1. Comparar métodos de obtención de extracto de levadura, a partir de una cepa liofilizada comercial de *S. cerevisiae*, evaluando el rendimiento de la biomasa obtenida, así como la capacidad de reducción de viabilidad celular.

### B. Específicos

1. Producir *S. cerevisiae* para la obtención de extracto de levadura, utilizando la cepa seleccionada, por medio de un método de crecimiento de microorganismos tradicional.
2. Evaluar los métodos de lisis celular utilizados, por medio de análisis de viabilidad celular de cada uno para la obtención del producto final para la maximización de la lisis.
3. Evaluar el crecimiento de las levaduras según el método determinado, por medio de estudios de viabilidad microbiológica de la cepa analizada, previo a los procesos de obtención del extracto.

## V. MARCO TEÓRICO

### C. Levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares, específicamente hongos, los cuales se encuentran fácilmente en la naturaleza. Estos están presentes en los suelos, plantas e incluso en los organismos de algunos animales. Debido a esto, existe una gran gama de cepas de levaduras, las cuales pueden variar en función, cinética de fermentación, y tolerancia a condiciones de crecimiento.

**Figura 1.** *Levaduras*



Fuente: (ISTOCK, 2024)

En general, estos organismos cumplen una función de descomponer materia muerta de animales o plantas en diversos ecosistemas. Esto es posible a partir de que se alimentan de los azúcares presentes en los medios para su obtención de energía. Por lo tanto, esto da paso a un proceso básico de fermentación, en donde las levaduras descomponen los azúcares presentes y tienen la capacidad de generar nuevos compuestos más simples en el medio de crecimiento (Universidad Nacional del Litoral, 2023).

El crecimiento de levaduras puede darse con diferentes condiciones de crecimiento, en donde varían parámetros de pH, temperatura o sustrato, por supuesto, estas deben ser óptimas. Las levaduras tienen la capacidad de reproducirse en medios con un pH ácido entre 4.5-6 y temperaturas entre 25 °C -37 °C. Estos son microorganismos versátiles, los

cuales pueden alimentarse de fuentes de carbono fáciles de digerir como azúcares simples, ácidos orgánicos y hexosas, glicerina e incluso etanol (bioMérieux S.A, 2022).

Al variar las condiciones de crecimiento de las diferentes cepas, se metabolizan diferentes componentes que producen metabolitos. Esto provoca cambios físicos, químicos y organolépticos provocando un deterioro, o bien fermentación. Generalmente, aumenta su contenido de carbono, puesto que es su principal fuente de alimento y energía (Uribe, 2007).

Es importante mencionar que las levaduras han sido objeto de mejoras, especialmente por medio de la ingeniería genética y los avances en la biología molecular. Esto se ha generado a partir de nuevas necesidades en diversas áreas de investigación y otras aplicaciones industriales. Entre las razones principales para el uso de estas, es su facilidad de cultivo y rápido tiempo de crecimiento. Esto ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas en el área de la genética para manipular y estudiar más a fondo las levaduras a nivel celular (Uribe, 2007).

Por otra parte, las levaduras contienen una amplia gama de metabolitos de interés biotecnológico, en donde se toman en cuenta proteínas recombinantes, enzimas industriales e incluso biocombustibles. Esto puede llevar a la optimización de procesos industriales, especialmente como en la fermentación para el aumento de la producción y eficiencia de los metabolitos. De igual manera, las levaduras tienen la capacidad de degradar contaminantes presentes en el ambiente. Por lo tanto, se pueden considerar como candidatas prometedoras en el campo de biorremediación en la descontaminación de suelos, ambientes contaminados y aguas residuales (Uribe, 2007).

#### **D. Crecimiento de levaduras**

Las células de levadura tienen la capacidad de ajustar su crecimiento y propagación en medios adecuados. Para esto, es indispensable la presencia de los nutrientes necesarios para que la levadura pueda mantenerse viable, así como para reproducirse. La respuesta de estas células ante el entorno nutricional, puede modificar la tasa de crecimiento al alterar la duración del ciclo celular (Broach, 2012).

Las formas de propagación de las levaduras pueden variar dependiendo de las condiciones que tenga el medio de cultivo utilizado. En caso de medios ricos en nutrientes, se activa un crecimiento mitótico rápido. Por otra parte, al tratarse de medios en donde los nutrientes están limitados, se establece un crecimiento filamentoso. También, es posible que las células estén en un estado de inactividad, en los cuales se inactiva reversiblemente la respuesta a la inanición de un solo nutriente (Broach, 2012).

Por supuesto, en el crecimiento de levaduras no se puede dejar de lado el metabolismo de los nutrientes, puesto que es a partir de estos procesos donde se genera energía. En estos se crean los componentes básicos para la síntesis biológica de macromoléculas. A partir de esto, se da la capacidad de separación de células, en donde partiendo de una sola célula se forman dos (Bauer et al., 2006).

Las levaduras tienen la capacidad de crecer en una amplia variedad de compuestos como fuentes de energía, siempre y cuando estas contengan carbono. A pesar de esto, estas células toman como primera opción la glucosa o fructosa. Entre las principales fuentes de carbono, se encuentran los mono-, di- y trisacáridos, como la sacarosa. Esto quiere decir que las levaduras tienden a tener mejores rendimientos de crecimiento con fuentes de carbono fermentables sobre otras fuentes como el glicerol y otros compuestos que deban ser metabolizados por medio de una fosforilación oxidativa (Broach, 2012).

La jerarquía en la que las levaduras deciden que sustrato consumir primero, se basa a partir de la regulación alostérica de diversas enzimas específicas presentes en las rutas metabólicas de glucólisis y gluconeogénesis. Además, se dan procesos en donde se evita la codificación de componentes de la cadena de transporte de electrones. Por esto, se favorece la fermentación y no los procesos de fosforilación oxidativa (Broach, 2012).

Aparte de la presencia de fuentes de carbono como uno de los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras, se debe considerar también la presencia de nitrógeno. Este compuesto, al ser limitante en el medio, puede llegar a desacelerar el crecimiento de las levaduras. Esto ocurre a partir de la reducción de la biogénesis y la traducción ribosómica, lo cual puede resultar en la expansión de la fase G1 del ciclo de la célula (Bauer et al., 2006).

En caso, se trabaje con un medio sin disponibilidad de nitrógeno, las células pueden dejar de crecer por completo. Incluso, es posible que con los otros nutrientes presentes estén en exceso, o simplemente presentes, y las células de levadura entren en un estado sin actividad. Este estado surge a partir de la ausencia directa de algún compuesto nitrogenado. Las células privadas de este compuesto tienen la capacidad de conservar su viabilidad por periodos prolongados. En su lugar, se suprime el catabolismo, por lo que no se consume la glucosa en el medio. Esto sugiere que las levaduras se adaptan a los nutrientes disponibles y acoplan su tasa de crecimiento a la disponibilidad del nitrógeno disponible (Bauer et al., 2006).

De igual manera, en los medios de crecimiento de las levaduras, se deben considerar otros nutrientes como el fosfato y el azufre. La ausencia de estos compuestos, puede de igual manera mantener a las levaduras en un estado quiescente. Por lo tanto, la fermentación de la glucosa, o bien la propagación de las células puede ser detenida. Esto ocurre, sin que realmente se agote la fuente principal de carbono, lo cual quiere decir que esta no se agota pero las levaduras no son capaces de metabolizarla (Amini y Botstein, 2008).

Por el contrario, al tener disponibilidad de todos los nutrientes principales para la crecimiento de las levaduras, es posible metabolizarlos. Esto implica que al consumir por completo el sustrato principal, este se fermenta y puede llegar a la producción de etanol como producto principal si fuese el caso. De igual manera, si es conveniente, se puede llegar a producir una mayor cantidad de biomasa de levadura, según la capacidad de consumo de la levadura. Por supuesto, el etanol producido en el medio, no interfiere con la producción de biomasa de levaduras, aunque en niveles demasiados altos puede llegar a alcanzar niveles ligeramente tóxicos (Amini y Botstein, 2008).

### **E. Fases de crecimiento de levaduras**

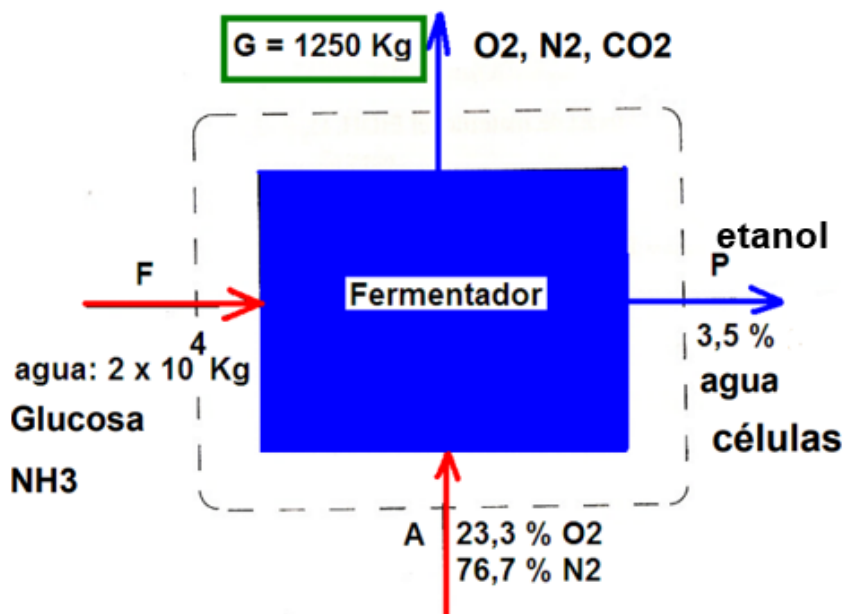
Las células de levadura, así como el de muchas otras bacterias, pasan por diferentes fases de crecimiento. En la literatura, se encuentran tres fases principales de crecimiento. Si se toma en cuenta la fase de muerte de levadura como parte del ciclo de las levaduras, se tienen cuatro fases en total (Madigan et al., 2015).

La primera fase se conoce como la fase de latencia o fase lag. En esta fase, las levaduras son introducidas en un nuevo medio de cultivo y necesitan tiempo para su adaptación a los nutrientes disponibles. Tras la adaptación a las nuevas condiciones ambientales, sintetizan las enzimas y proteínas indispensables para el crecimiento próximo. La duración de esta fase puede variar dependiendo de factores como la edad de la célula o la composición del medio de cultivo. Además, se presenta la mayor actividad metabólica sin realmente llegar a una división celular (Madigan et al., 2015).

La fase siguiente, se conoce como la fase exponencial o fase log. En este punto, las levaduras presentan un crecimiento y división en una tasa rápida. Esto implica que las células se duplican a una tasa constante, y la concentración puede aumentar de manera exponencial. Esta fase puede mantenerse siempre y cuando exista la disponibilidad de nutrientes en el medio. Por la parte bioquímica, en esta fase es cuando ocurre una mayor síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Esta fase puede ser considerada la más importante en la industria, donde se tiene la producción más eficiente de etanol (Madigan et al., 2015).

La tercera fase, la fase estacionaria, llega cuando los nutrientes inician a agotarse o inicia una acumulación de productos tóxicos para las levaduras. Esto quiere decir que el crecimiento de las levaduras se ralentiza y eventualmente se detiene. En esta fase, la división celular es equivalente a la tasa de muerte celular. La duración de esta última fase de crecimiento depende de la capacidad de las células de sobrevivir en un estado de estrés, sin suficiente alimento para la reproducción constante. En algunas ocasiones, la prolongación de esta fase puede ser beneficioso para la producción de ciertos metabolitos de interés. Es en esta fase, donde también inicia la producción de etanol. En la siguiente figura, se encuentra un balance de masa teórico de los componentes involucrados en la fermentación y propagación de levaduras (Madigan et al., 2015).

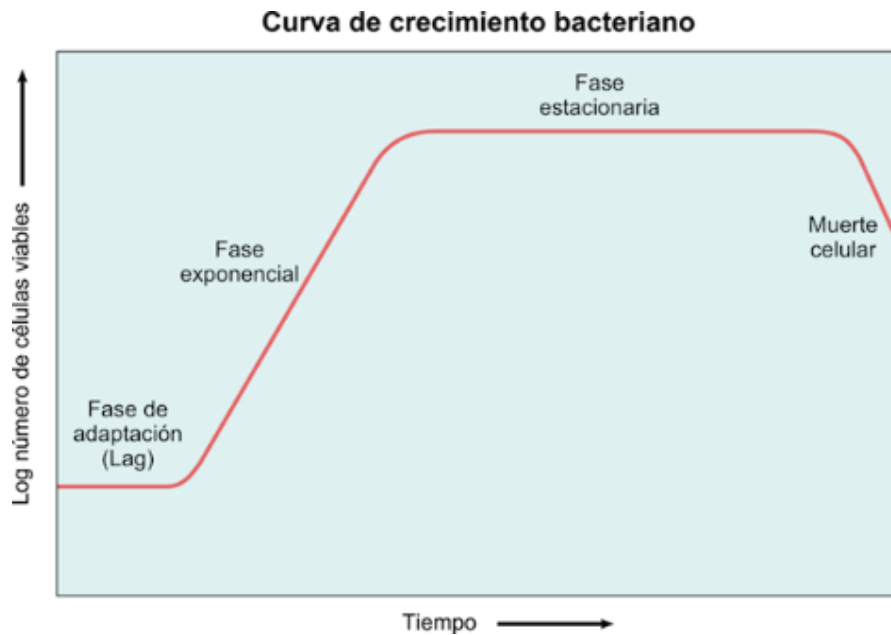
**Figura 2.** Balance de masa teórico de fermentación



Fuente: (Universidad de Buenos Aires, 2010)

Finalmente, después de pasar por la fase estacionaria es posible que las células de levadura no puedan sobrevivir. En caso las condiciones sigan siendo desfavorables para la reproducción de las levaduras, están entran en una fase de muerte. En esta, el número de células viables disminuye de manera exponencial. La muerte de las células puede deberse a varios factores, como el agotamiento de nutrientes, presencia de productos tóxicos o condiciones de estrés naturales o inducidas. Esta fase puede tener una duración variable y depende completamente de las condiciones. Para algunas aplicaciones es crucial evitar llegar a esta fase, mientras que en otras específicas se busca llegar a la muerte (Barnett et al., 2000).

**Figura 3.** *Curva de crecimiento teórica de células*



Fuente: (Lifeder, 2024)

En la figura anterior, se presentan las fases de crecimiento bacteriano de manera gráfica. Se representan las 4 fases principales descritas anteriormente, con sus nombres respectivos. En esta, además se incluye la fase de muerte celular, la cual no es incluida en todas las gráficas representativas del ciclo de vida de las células.

## **F. Viabilidad de levaduras**

Es importante mencionar el estudio de la viabilidad y control de las células de levaduras en cualquier procedimiento que se concentre en el estudio de estas. Esta es una parte esencial, en donde se determina si la cepa utilizada y analizada es capaz de reproducirse. Se realiza esta parte con el objetivo de determinar si la célula será capaz de provocar una fermentación alcohólica una vez se encuentre en sus condiciones óptimas, con una alta eficiencia (Araóz, et. all, 2016).

Entre los principales factores que afectan la viabilidad se encuentran las condiciones de crecimiento, en donde la temperatura y pH, así como factores ambientales pueden afectar. Además, es necesario que se encuentren suficientes nutrientes en su medio de

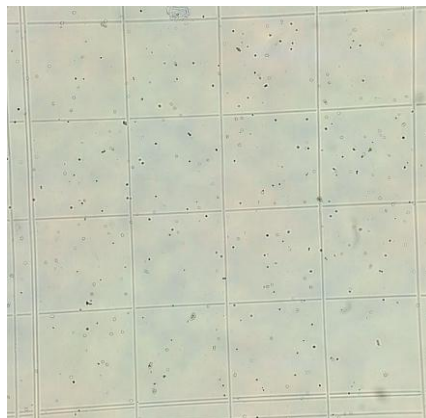
crecimiento para que las células puedan crecer óptimamente y seguir reproduciéndose. Por supuesto, los factores de estrés ambiental como la presión osmótica pueden afectar negativamente en el crecimiento de las levaduras y por consiguiente, en su viabilidad (Araóz, et. all, 2016).

En la industria, es común realizar estudios de viabilidad celular para garantizar la calidad del producto final, especialmente en la industria alimentaria. Esto debido a que existe una gran variedad de productos en donde las levaduras son parte de las materias primas clave para obtener el producto final deseado. De esta manera, es posible asegurar la eficacia del proceso realizado (UNL, 2020).

Existen varios métodos para evaluar la viabilidad de las levaduras, en donde se determina la proporción de células vivas en el medio. Entre los más comunes se toma en cuenta la tinción con azul de metileno, el cual consiste en la tinción de las células con este compuesto. Este es funcional, pues las células muertas se tiñen con facilidad debido a la ruptura de la pared celular. La proporción de las células vivas con las lisadas se determina por medio de un análisis microscópico (Pardo y Glavano, 2009).

Para completar este conteo, se utiliza la cámara de Neubauer, la cual tiene una cuadrícula con la que se puede dividir en secciones para facilitar el conteo. A partir de esta, se realiza el cálculo respectivo dependiendo de la sección de la cámara en la que se haya realizado el conteo. Además, al utilizar azul de metileno en esta cámara, es posible diferenciar las células vivas de las no viables, puesto que estas últimas se tiñen de azul al tener la pared celular rota (Pardo y Glavano, 2009).

**Figura 4.** *Muestra de levaduras en cámara de Neubauer para recuento de células viables y no viables*



Fuente: propia

En la figura 2, se observa la cuadrícula de la cámara de Neubauer con presencia de células de levadura. En esta se determinan células viables incoloras internamente, lo cual indica que la pared celular sigue intacta. Por otro lado, se observan células de color azul, indicando la presencia de células no viables. De esta manera, se puede realizar el recuento tanto total de las células, como diferenciando entre ellas (Pardo y Glavano, 2009).

Además, es posible realizar un conteo de colonias, el cual consiste en un recuento de las colonias en placas con medio de cultivo sólido. Este método consiste en diluir muestras de levaduras y realizar la siembra del medio diluido en placas de agar. Al incubar las placas, permite que las células viables formen colonias individuales y se pueda realizar un conteo tras terminar el proceso de incubación. Este método se considera como uno de los más eficientes, puesto que permite obtener un dato rápido y cuantitativo sobre la viabilidad de las levaduras (Pardo y Glavano, 2009).

#### **G. Lisis celular**

Las levaduras pueden llegar a sobrevivir ante ciertas condiciones extremas sin alterar significativamente su viabilidad. Para que este proceso se pueda llevar a cabo, es necesario que la membrana celular de las levaduras pueda romperse. Esta membrana es gruesa en

estas células y está compuesta de proteínas y polisacáridos. Esta parte de las células representa entre el 20-30% de su peso seco (Aguilar et al., 2005).

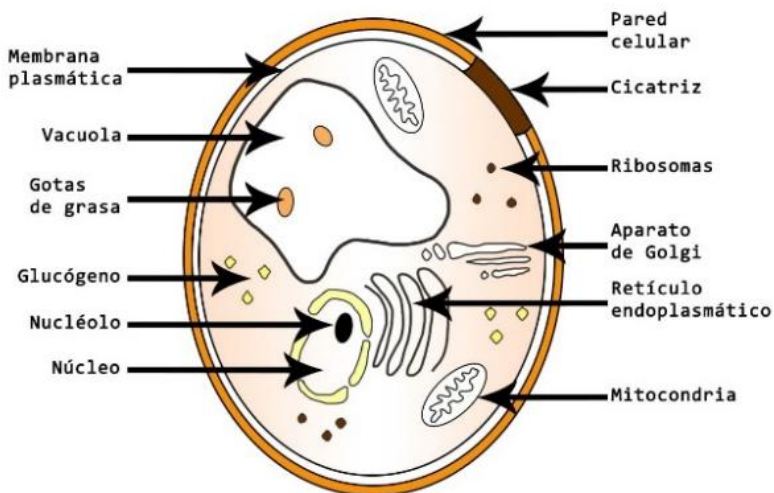
Esta parte de la célula esta encargada de la protección de la célula de ataque enzimáticos, dando una mejor estructura, así como la forma a la célula. La composición de la pared celular, puede variar en respuesta al estrés en el que se encuentre la levadura. Entre esto, por supuesto se consideran las condiciones de cultivo, edad de la célula e incluso modificación genética. Al ser constituida por principalmente  $\beta$ - glucanos, las levaduras pueden soportar y resistir ante cambios osmóticos y mecánicos (Lipke y Ovalle, 1998).

Por otra parte, la pared celular también contiene manoproteínas, las cuales se encuentran ubicadas en la capa externa de la célula. Estas son además las encargadas de la porosidad de la pared, por lo que pueden proteger la célula ante ciertos ataques químicos y enzimáticos. A pesar de que existen estructuras dentro de la pared celular, que están encargadas de la protección e integridad de las células, estas no son resistentes condiciones específicas (Aguilar et al., 2005).

Dependiendo de la aplicación de la lisis celular, es posible realizar una lisis parcial o completa. En la primera, no se disrompe la célula en su totalidad, sino que únicamente en una pequeña sección de la pared. Por otra parte, la lisis celular completa implica la desintegración completa de la membrana celular para la obtención del contenido de la célula (Goodfellow y Stackerbrandt., 1991).

Para llegar a una lisis celular de manera intencional, es necesario llevar a las células a condiciones que no puedan ser soportadas por ellas. De esta manera, la membrana de la levadura se rompe y el material intracelular puede ser liberado. En el caso de las levaduras, se busca obtener principalmente las proteínas que estas células contienen, pues son de gran beneficio en sus diversos usos (Goodfellow y Stackerbrandt., 1991).

**Figura 5. Partes de levadura**



Fuente: (Canalupe, 2024)

## H. Métodos de lisis celular

Existen diversas formas en las que es posible llegar a una lisis celular completa. Estos métodos logran liberar los contenidos de las células. Algunos de los métodos implican el uso de equipos más sofisticados, los cuales no son necesariamente de fácil acceso. Por el contrario, existen diferentes métodos en donde un cambio de condiciones de cultivo puede llevar a las células a viabilidades bajas, o nulas.

Los métodos principales de lisis celular varían en el cambio de condiciones de crecimiento de las levaduras. Es posible realizar un aumento considerable de temperatura en comparación a la de incubación. Esto causa estrés en las células y provocan que las paredes celulares se rompan. En general, se encuentra que las levaduras pueden realizar el proceso de lisis a partir de una temperatura de 70°C, pero el tiempo de contacto o exposición a la temperatura elevada es lo que define si las células pueden romperse o no. Además, existe una variación en la temperatura de lisis de las levaduras, dependiendo del tipo de cepa con la que se trabaje. Especialmente al trabajar con levaduras nuevas, es decir no utilizadas para ningún otro proceso, estos microorganismos pueden ser más resistentes a altas temperaturas. Es en esto, donde el tiempo de exposición a la temperatura elevada

tiene una mayor importancia. En algunos casos, es necesario llegar a temperatura de ebullición para alcanzar una viabilidad de 0, si se requiere (Montero, 2005).

En segundo lugar, puede ser utilizada una hidrólisis ácida en donde el aumento del pH es lo que provoca esta misma ruptura celular. Por supuesto, por la alta resistencia de las levaduras, es necesario que las soluciones utilizadas tengan una concentración de al menos 1M, tomando en cuenta que las levaduras tienden a crecer en condiciones ácidas. Es evidente que el tiempo de exposición, o de reacción es clave para que el proceso de lisis pueda darse a cabo. En el caso de esta hidrólisis, el tiempo de reacción para obtener células lisadas, tiende a ser menor que con otros métodos (Jacob et al., 2019).

También, es posible realizar este procedimiento de una forma parecida, pero con soluciones básicas; es decir, una hidrólisis básica. Igualmente, la concentración de la solución utilizada debe ser de al menos 1 M para que la reacción básica tenga efecto en las células expuestas de manera eficiente. Esta última técnica no es una práctica tan común y ha sido investigada poco. Aun así, este método puede ser respaldado al tomar en cuenta las condiciones óptimas de crecimiento de las levaduras. En estas se toma en cuenta un medio con pH ácido, por lo que someter las levaduras en medios básicos puede provocar su muerte (Montero, 2005).

Adicionalmente, existen técnicas básicas mecánicas, en donde la pared celular es físicamente rota para la liberación de sus constituyentes. Entre las maneras más comunes de utilizar este método de lisis se encuentra la homogeneización, en donde las células se suspenden en un medio de lisis y se someten a intensas fuerzas mecánicas. Lo mismo ocurre con el proceso de sonicación y molienda, en donde se utilizan componentes externos que entran en contacto directo con las levaduras. Esto causa que las células se debiliten hasta romperse (Jacob et al., 2019).

Por otra parte, se pueden utilizar métodos más complejos como la liofilización y molienda criogénica, en donde se elimina el agua primero y luego se muelen las células mecánicamente. Esto es útil para conservar y preservar la integridad de los componentes intracelulares sensibles al calor que se contienen en las células de levadura (Montero, 2005).

Los diferentes métodos de lisis varían en eficacia en el proceso de obtención de extracto de levadura, los cuales dependen de accesibilidad, o bien, de la cepa de levadura en sí. Por supuesto, todos llegan a causar el efecto deseado, pero el tiempo de exposición a cada método o la intensidad a la que se someta el microorganismo, hace variar el método. La elección de un método de lisis celular varía en cuestiones de tiempo, recursos escala de proceso y de fondos para la ejecución del método. Además, se toma en cuenta el uso que se busque, así como si se la preservación de componentes internos, conservación del producto final o eficiencia del proceso general (Montero, 2005).

## **I. Extracto de levadura**

Este es un compuesto que se conforma de una mezcla de proteínas y aminoácidos que tienen diferentes usos en las diversas industrias. El extracto de levadura es soluble en agua, obtenido a partir de células de levaduras lisadas. Además, tienen un gran contenido de vitaminas, especialmente del complejo B, nitrógeno por la alta presencia de aminoácidos y nucleótidos (Salinas, 2022).

En la industria alimentaria, se caracteriza por aportar complejidad a los sabores de los alimentos. También, es comúnmente utilizada como un sustituto de la sal y enriquecedor nutricional debido a su gran composición de vitaminas, minerales y proteínas. Por otra parte, puede ser utilizado para mejorar la textura y sabor de los alimentos para aumentar la calidad sensorial de estos. Aparte, es una excelente adición a productos veganos, gracias a su contenido proteico. Este producto aporta también propiedades probióticas al ser un microorganismo activo y beneficioso para el microbiota (Salinas, 2022).

**Figura 6.** *Extracto de levadura granulado*



Fuente: (VidalForce, 2024)

Por otra parte, en la microbiología es normalmente utilizado como parte de otros medios de cultivo, debido a su contenido nutricional. Este es usado gracias a su alto contenido de nitrógeno y minerales, los cuales promueven el crecimiento de otros microorganismos, especialmente cuando se requieren condiciones controladas, como es el caso de los laboratorios microbiológicos. También tiende a acelerar el crecimiento de organismos, incluyendo otras levaduras o mohos (Bioser, 2023).

#### **J. Obtención de extracto de levadura**

Este producto se obtiene a partir de las levaduras frescas o residuales, es decir en crecimiento primario o por medio de procesos de fermentación. El producto obtenido puede presentarse en forma líquida, pasta o polvo. El proceso inicia con la fermentación de la levadura, en donde la célula se debe presentar como viable, demostrado por una tasa de crecimiento alta en condiciones ideales. Esto puede variar dependiendo de la cepa, tomando en cuenta el sustrato utilizado y características del microorganismo. Se deben mantener los niveles también de oxígeno y temperatura para optimizar el crecimiento de estos (Otero, 2010).

Como segunda etapa, se tiene el proceso de ruptura de las células, lo cual se conoce como la lisis celular. Esto representa la ruptura de las paredes celulares para solubilizar el contenido de las células de la levadura. Por supuesto, existen diversos métodos de lisis, los cuales pueden variar el rendimiento del proceso y calidad de la célula lisada. Este es un proceso en el que las enzimas de la levadura dividen a los otros componentes de esta para liberar sus constituyentes. Entre los principales liberados, se encuentran las proteínas descompuestas por las enzimas (Otero, 2010).

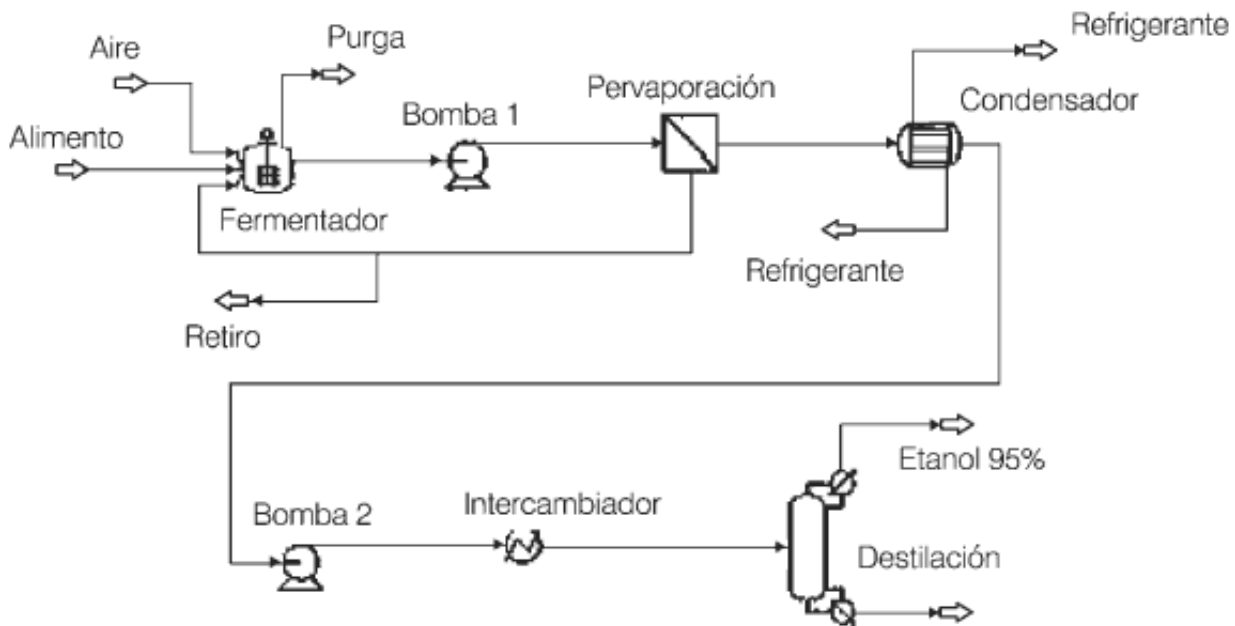
Una vez se obtienen las levaduras lisadas es necesario seguir procesos específicos para obtener el extracto. Para esto, se realizan operaciones unitarias como la centrifugación, en donde se separa la parte líquida de la sólida. Otra de las operaciones de separación utilizadas puede ser la filtración, utilizando los filtros adecuados al tamaño de partícula de la levadura. Dependiendo de la pureza o aplicación buscada se puede mantener el sedimento o el sobrenadante. Luego de esto, puede seguir un proceso de evaporación al vacío, en donde se busca la eliminación de la mayor parte del agua. También puede realizarse un proceso de liofilización, aunque esta operación no es común en la industria. Aparte, es posible realizar un proceso de secado, en caso se decida conservar el sedimento obtenido en el proceso de centrifugación (McAuliffe et al., 2017).

Una vez se obtiene el producto, es posible ajustar la composición del extracto por medio de la estandarización del contenido de sal, proteínas o aminoácidos. En ocasiones, el extracto se mezcla con otros compuestos o bien, con diferentes lotes de extracto para garantizar uniformidad. Además, es común agregar ciertos conservantes para mantener la integridad del producto por periodos prolongados (McAuliffe et al., 2017).

## **K. Equipos involucrados**

En la producción y obtención del extracto de levadura, existen ciertos equipos que son clave para el proceso general. Este proceso, involucra una serie de operaciones unitarias las cuales requieren de equipos específicos para llevar a cabo cada etapa. Estos equipos son necesarios para mantener un control y obtener altos rendimientos en la producción del extracto de levadura (Stanbury et al., 2016).

**Figura 7.** Diagrama de flujo de fermentación industrial



Fuente: (Sánchez y Cardona, 2005)

En la figura anterior, se encuentra un diagrama de flujo del proceso de obtención de etanol a escala industrial. En este proceso, es posible hacer modificaciones, en donde se realice la recuperación de la biomasa utilizada para este proceso. De esta manera, la obtención de la biomasa sería una extensión del proceso de obtención de etanol, sin alterar su curso.

Los biorreactores son uno de los principales equipos que en todas las variantes del proceso deben ser utilizados. La función de estos es fundamental para el cultivo de las levaduras y así obtener rendimientos altos de producción. Estos tienen la capacidad de mantener las condiciones ideales de crecimiento de las levaduras, como el pH, aireación, agitación y temperatura. Existen diferentes tipos de reactores, pero entre los más comunes se encuentran los biorreactores de tanque agitado y de columna de burbujas (Stanbury et al., 2016).

**Figura 8. Biorreactor**



Fuente: (Sysbiotech, 2024)

Dependiendo del tipo de método de lisis celular que se utilice, es el equipo que se debe implementar en el proceso. En esta parte del proceso, pueden instalarse equipos como homogeneizadores de alta presión o molinos de bolas para una lisis mecánica. Por otra parte, es posible utilizar reactores para facilitar autólisis. Entre los métodos de lisis que pueden realizarse a partir de un reactor son los métodos de aumento de temperatura para mayor control de esta variable. También, pueden realizarse hidrólisis ácidas o básicas, así como lisis enzimáticas (Fellows, 2009).

Luego de esto, es necesario implementar equipos para la separación de compuestos como centrífugas. Estas tienen como objetivo la separación del sedimento de levadura del sobrenadante. En estos casos, pueden utilizarse centrífugas de tambor o centrífugas decantadoras. Además, pueden implementarse filtros de presión, los cuales tienen la

capacidad de clarificar el extracto de levadura, eliminar cualquier material celular residual sólido no deseado (Stanbury et al., 2016).

**Figura 9.** *Centrífuga industrial*



Fuente: (Saideli, 2024)

## VI. METODOLOGÍA

### A. Preparación de medios de cultivo

#### Materiales

1. Probeta de 100 mL
2. Erlenmeyer 25 0mL
3. Balanza analítica
4. Espátula
5. Urea
6. Azúcar
7. Agar DPA
8. Cajas Petri

#### Procedimiento

1. Preparar medio formulado:
  - a. 2 g/L de urea
  - b. 20 g/L azúcar comercial
2. Preparar 100 mL del medio.
3. Esterilizar por 15 minutos a 121.5 °C.
4. Preparar 310 mL de agar PDA, se esteriliza y se preparan 15 placas.
5. El pH debe mantenerse entre 4-6.

### B. Aislamiento de cepa de levadura

#### Materiales

1. Incubadora
2. Levadura comercial liofilizada
3. Asa bacteriológica
4. Placa con cepa aislada
5. Mechero

6. Cajas Petri con agar PDA
7. Medio inoculado

### Procedimiento

1. Inocular 2 g/L de levadura comercial en el medio líquido previamente preparado.
2. El medio inoculado, se deja fermentar en incubadora a 27 °C por tres días con agitación.
3. Una vez pasado el tiempo, tomar una pequeña muestra con un asa bacteriológica previamente esterilizada.
4. Inocular esta muestra con una técnica de aislamiento en una de las placas de agar PDA previamente preparadas.
5. Incubar a 37 °C por un día en una incubadora.
6. Elegir la cepa adecuada para su propagación, una vez se tengan las colonias sembradas.
7. Tomar de nuevo con un asa bacteriológica esterilizada, una pequeña cantidad de la colonia aislada seleccionada.
8. Inocular una nueva placa con técnica de estriado de propagación de colonias, realizar duplicado.
9. Una vez listas las placas con la cepa aislada y propagada, pueden ser utilizadas para los siguientes pasos.

### **C. Propagación de células de levadura**

#### Materiales

1. Erlenmeyer 250 mL
2. Erlenmeyer 500 mL
3. Erlenmeyer 1 L
4. Erlenmeyer 5 L
5. Balanza analítica
6. Espátula

7. Probeta 1 L
8. Placas de agar PDA
9. Incubadora con agitación
10. Incubadora

### Procedimiento

1. Preparar 100 mL del medio especificado según el procedimiento detallado en la sección a de la metodología (capítulo VI) en triplicado.
2. Tomar una cantidad de células de las placas con la cepa seleccionada aislada y se inocula con un asa bacteriológica esterilizada en los medios preparados.
3. Incubar los medios inoculados en incubadora con agitación a 100 rpm y 29 °C por 2 días.
4. Preparar 250 mL del medio determinado en triplicado, nuevamente.
5. Enfriar el medio después de salir de la incubadora, se agregan los 100 mL del medio fermentado en el paso anterior al medio nuevo. En esto, se tiene un volumen total de 350 mL en cada repetición.
6. Fermentar medios nuevamente a 29 °C y 100 rpm por 2 días.
7. Preparar 475 mL del mismo medio previamente preparado y se deja enfriar posterior a la esterilización del medio, en duplicado.
8. Inocular 525 mL del medio ya fermentado anteriormente en cada Erlenmeyer recién preparado. El volumen total de cada medio debe ser de 1 L, en duplicado.
9. Incubar esto nuevamente a 29 °C con 100 rpm de agitación por 3 días.
10. Una vez pasado el periodo de incubación, dejar sedimentar por al menos 3 horas los medios fermentados.
11. Preparar 2.6 L de medio de cultivo líquido de la misma formulación, en un Erlenmeyer de al menos 4 L y dejar enfriar, posterior a la esterilización.
12. Cuando haya sedimentado el medio previamente fermentado, retirar alrededor de 300 mL de cada medio ya fermentado, evitando remover la biomasa del medio.
13. Inocular al nuevo medio recién preparado, el resto del medio fermentado, es decir alrededor de 700 mL de cada medio fermentado,
14. Incubar a 30 °C por 5 días.

## **D. Propagación en reactor**

### Materiales

1. Biorreactor 100 L
2. Control de temperatura
3. Agitador
4. Balanza industrial
5. Cubeta 40 L
6. 4 L de medio inoculado

### Procedimiento

1. Llenar reactor con agua y agitación por 20 minutos y luego drenar, las veces necesarias para que quede limpio.
2. Preparar 81L de medio con una concentración de 65 g/L de azúcar y 4 g/L de urea.
  - a. Mantener un flujo de aire de 0.5 m<sup>2</sup>/s a 29 °C.
  - b. Establecer agitación a 200 rpm.
  - c. Dejar la producción de biomasa por cuatro días.
3. Una vez terminado el tiempo de fermentación determinado, extraer del reactor el medio fermentado a cubetas previamente desinfectadas.
4. Realizar lavados con agua a las paredes del reactor para obtener toda la biomasa generada durante la incubación.
5. Esperar a que las células puedan sedimentar para realizar una separación inicial.
6. Centrifugar el medio por 15 min, a 3500 rpm.
7. Extraer el sedimento, tanto del medio centrifugado, como el extraído del reactor y pasarlo a un beaker limpio. Tapar para evitar contaminación externa y mantener en refrigeración.

## **E. Estudio de viabilidad celular**

### Materiales

1. Cámara de Neubauer
2. Azul de metileno
3. Tubo de ensayo de 10 mL
4. Micropipeta de 100  $\mu$ L
5. Puntas para micropipeta
6. Microscopio
7. Placas de agar PDA
8. Asa bacteriológica
9. Mechero
10. Incubadora
11. Piseta de agua destilada

### Procedimiento

1. Utilizar como método principal el conteo con la cámara de Neubauer.
  - a. Colocar pequeñas gotas de la dilución 1:100 en la cámara.
  - b. Añadir azul de metileno y se deja reposar por 1-2 minutos.
  - c. Observar colonias bajo el microscopio y realizar el conteo.
  - d. Diferenciar las colonias vivas de las muertas.
  - e. Realizar estadística y cálculos para determinar cantidad de células en cada muestra.
  - f. Determinar viabilidad por medio de cálculo correspondiente para determinar porcentaje de viabilidad celular en cada muestra.
2. Realizar también un conteo en placas de agar PDA.
  - a. Sembrar las muestras diluidas en 1:100 obtenidas en las placas.
  - b. Dividir cada placa en cuatro partes iguales y se identifican según corresponde.
  - c. Tomar 20  $\mu$ L de cada una de las muestras diluidas en 1:100 (las mismas utilizadas para su observación en la cámara de Neubauer).

d. Tomar un asa previamente inoculada y cada muestra es estriada en su espacio de la placa correspondiente. Se incuba la placa por 24 h a 37 °C.

e. Luego de incubada, realizar el conteo de colonias por cada muestra inoculada.

\*Este es el procedimiento que se sigue cada vez que se utiliza la cámara de Neubauer en este cada parte del procedimiento.

## **F. Curvas de crecimiento**

### Materiales

1. Tubos de ensayo de 10 mL
2. Micropipeta de 1 mL
3. Agua destilada
4. Probeta de 10 mL
5. Placas de agar PDA

### Procedimiento

1. Iniciar la toma de muestras del medio inoculado desde las 0 h de fermentación.
2. Tomar muestras de 11 mL cada media hora por las primeras 6 horas desde la inoculación.
3. Luego de esto, dejar seguir la fermentación de forma ininterrumpida.
4. Tomar 1 mL de cada muestra por aparte para la siembra en las placas de agar PDA previamente preparadas.
  - a) Diluir las muestras en al menos 1:100, para facilitar el conteo de colonias en placas. En caso ser necesario, diluir en 1:100.
  - b) Observar la dilución en la cámara de Neubauer, según procedimiento previamente explicado.
5. Centrifugar las alícuotas obtenidas por 15 minutos a 3800rpm para eliminar la biomasa residual de cada muestra.
  - a) Cuantificar la biomasa obtenida de las muestras por su peso.
  - b) Enviar a análisis de HPLC para la cuantificación de azúcares en el medio.

6. Tomar los datos de conteos de colonias, por crecimiento en agar, así como de la cámara de Neubauer.
7. Tomar datos del consumo de sustrato con respecto al tiempo.

## **G. Métodos de lisis**

### **a. Cambios de temperatura**

#### Materiales

1. Pasta de levadura
2. Balanza analítica
3. Beaker 250 mL
4. Termómetro
5. Agitador magnético
6. Plancha de calentamiento con agitación
7. Micropipeta de 100  $\mu$ L
8. Puntas para pipeta
9. Tubos de ensayo de 10 mL

#### Procedimiento

1. Agregar en un beaker alrededor de 3 g de la pasta de levadura y agregar 100 mL de agua destilada.
2. Someter beaker a un aumento de temperatura para llegar a la lisis celular.
3. En plancha de calentamiento con agitación, elevar la temperatura de la mezcla de agua y levadura hasta llegar a ebullición.
  - a. Aumentar la temperatura gradualmente con respecto al tiempo.
4. Tomar alícuotas de 100  $\mu$ L cada 10  $^{\circ}$ C en el aumento de temperatura, para determinar la viabilidad celular.
5. Tomar la temperatura y tiempo alcanzado con cada alícuota tomada.
6. Observar las muestras obtenidas en la cámara de Neubauer y siembra en placas para determinar su viabilidad celular con respecto a la temperatura.
  - a. Diluir las muestras en 1:100.

- b. Como segunda parte de la experimentación con temperatura, exponer un beaker con la misma cantidad de levadura a esta temperatura definida.
- c. Tomar el tiempo que tarda en llegar a una viabilidad de 0 %, al exponer a esta temperatura constante.
  - i. Tomar alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  cada minuto en esta modalidad.
  - ii. Observar muestras en cámara de Neubauer para determinar la efectividad de la temperatura.

## **b. Hidrólisis ácida y mecánica**

### Materiales

1. 10 beakers de 50 mL
2. 2 pipetas 5 mL
3. Micropipeta de 100  $\mu\text{L}$
4. Puntas para micropipeta
5. Tubos de ensayo de 10 mL
6. Soluciones ácidas de 0.5 M, 1 M y 1.5 M
7. Pasta de levadura
8. Cronómetro

### Procedimiento

1. Agregar en 10 beakers de 50 mL alrededor de 0.5 g de pasta de levadura obtenida en cada uno.
2. Preparar 50 mL de solución de ácido clorhídrico de 0.5 M, 1 M y 1.5 M y 50 mL de solución de 0.5 M, 1 M y 1.5 M de NaOH.
3. Agregar en 5 beakers 2 mL de la solución ácida de 0.5 M y dejar que la reacción inicie.
4. Neutralizar cada beaker con 2.5 mL de la solución de NaOH con su respectiva concentración, en intervalos de 30 s consecutivamente, en donde el último en neutralizar tiene un tiempo de reacción de 10 minutos.

5. Tomar una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  en un tubo de ensayo, y se diluye con 10 mL de agua. Esto se repite con todas las alícuotas tomadas de las muestras realizadas de hidrólisis.
6. Repetir los pasos 3-5 con las soluciones ácidas de HCl.
7. Tomar una pequeña gota de cada una de las diluciones para observarlas en la cámara de Neubauer.
  - a. Como segunda parte de la experimentación, exponer un beaker con las mismas cantidades de levadura y soluciones, de nuevo con la solución ácida con el tiempo previamente determinado para la muerte total de la levadura.
  - b. Una vez pasado el tiempo, neutralizar completamente la solución.
    - i. Tomar alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  cada 20 s en esta modalidad.
    - ii. Observar muestras en cámara de Neubauer y siembra en placas para determinar la efectividad del tiempo de reacción.

### **c. Lisis mecánica**

#### Materiales

1. Licuadora
2. Agua destilada
3. Pasta de levadura
4. Micropipeta 100  $\mu\text{L}$
5. Puntas para pipeta
6. Cronómetro

#### Procedimiento

1. En un vaso de licuadora agregar alrededor de 3 g de pasta de levadura y agregar 100 mL de agua destilada.
2. Colocar el vaso sobre la base de la licuadora y se enciende a una potencia de alrededor de 10000 rpm.
3. Encender por 30 s y se toma una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ .
4. Repetir esto hasta llegar a un tiempo total de 15 minutos, con mediciones cada minuto, con sus respectivas alícuotas, dependiendo del decrecimiento de la viabilidad.

5. Observar las muestras obtenidas en la cámara de Neubauer.
6. Una vez realizado este estudio, determinar el tiempo de lisis a la que las todas las células mueren.
7. Observar muestras en cámara de Neubauer para determinar la efectividad del tiempo de reacción.

#### **d. Recuperación de biomasa**

##### Materiales

1. Centrífuga
2. Moldes de silicón
3. Espátula
4. Horno secador
5. Balanza analítica

##### Procedimiento

Para cada mezcla de levadura y agua tratada y muestras tomadas según su método de lisis celular:

1. Centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm.
2. Colocar esta biomasa sobre moldes de silicón resistentes a temperaturas elevadas, para evitar que el producto se adhiera a la superficie.
3. Dejar todas las muestras de biomasa recuperada en el horno a 60 °C, hasta que el agua sea eliminada de la biomasa.
4. Pesar cada muestra para determinar masa total de la biomasa producida y obtenida.

#### **e. Obtención del extracto de levadura**

##### Materiales

1. Extracto de levadura seco
2. Mortero
3. Balanza analítica

##### Procedimiento

4. Introducir la biomasa seca en un horno a 60 °C hasta que el agua sea eliminada de la levadura en su totalidad.
5. Pulverizar la levadura seca obtenida.
6. Recuperar todo el polvo de extracto de levadura obtenido en su totalidad y pesar nuevamente.

#### **f. Cuantificación de nitrógeno total**

##### Materiales

1. Balanza analítica
2. Extracto de levadura
3. Agua destilada
4. Tubo de ensayo
5. Hach
6. Reactivos para análisis proporcionados con el kit del equipo
7. Micropipeta 1 mL
8. Reactor
9. Tubos de ensayo para análisis proporcionados por el kit del equipo
10. Kimwipes
11. Gradilla para tubos de ensayo

## Procedimiento

1. Preparar una solución al 15 % de extracto de levadura en 5 mL de agua destilada
2. Utilizar el equipo Hach, con el cual se obtiene la concentración de la muestra analizada.
3. Iniciar el reactor DRB200 a 105 °C.
4. Agregar el contenido de un sobre de persulfato de nitrógeno a dos de los tubos de ensayo determinados para la cuantificación de nitrógeno total en concentraciones de 0-25 mg/L.
5. Agregar 2 mL de la muestra en uno de los viales.
6. Añadir 2 mL de agua desionizada al segundo vial y agitar ambos de forma vigorosa por al menos 30 segundos.
7. Poner los viales en el reactor y cerrar la tapa. Dejarlos por 30 minutos para que puedan reaccionar.
8. Sacar inmediatamente del reactor y dejar que se enfríen a temperatura ambiente.
9. Iniciar el programa en el equipo de Hach. Se elige el programa “350 N, Total LR TNT” con el botón de “START”.
10. Añadir los contenidos de un sobre de Nitrógeno total proporcionado por el kit del equipo, a cada vial.
11. Cerrar y agitar los tubos por 15 minutos. Se dejan reaccionar por 3 minutos.
12. Añadir el reactivo “B” a los viales y agitar por 15 segundos para disolver su contenido. Esta reacción toma dos minutos.
13. Añadir 2 mL de las muestras digeridas en el vial con los reactivos preparados.
14. En el otro vial, para el blanco, añadir 2 mL del blanco digerido.
15. Cerrar ambos viales y agitar en forma de inversión por 10 veces. Esta reacción toma 5 minutos.
16. Limpiar los viales preparados con “Kimwipes”.
17. Insertar vial del blanco en el portacelda del equipo. Presionar el botón de “ZERO” para establecer el valor de este vial.
18. Insertar vial que contiene la muestra en el portacelda del equipo. Presionar “READ”, en donde se obtiene la lectura en forma de concentración de mg/L de nitrógeno total.

## Análisis estadístico

1. Tomar en cuenta que los métodos se dividieron de la siguiente manera, para tener un total de 9 grupos, con diferentes resultados finales:
  - a. Lisis por cambios de temperatura
  - b. Lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua
  - c. Lisis mecánica
  - d. Hidrólisis ácida con solución a 0.5 M
  - e. Hidrólisis ácida con solución a 1.0 M
  - f. Hidrólisis ácida con solución a 1.5 M
  - g. Hidrólisis básica con solución a 0.5 M
  - h. Hidrólisis básica con solución a 1.0 M
  - i. Hidrólisis básica con solución a 1.5 M
2. Determinar el método que necesite el menor tiempo para llegar a una lisis completa. Este es el tiempo de referencia que se utiliza para el resto de los métodos evaluados.
3. Determinar la viabilidad de cada repetición en todos los métodos en el tiempo establecido de referencia.
4. Realizar un análisis de varianza de un factor en Microsoft Excel, una vez se agrupan los resultados de viabilidad, transcurrido el mismo tiempo para cada método. En este se deben mantener los resultados de las tres repeticiones realizadas para cada método.
5. Determinar dependiendo de los valores p y F, si se sigue el procedimiento, en caso se exista una diferencia significativa, o una alta variabilidad entre los grupos comparados. Tomar en cuenta un nivel de significancia del 95 %.
6. Sacar los promedios de cada método, utilizando las viabilidades de las tres repeticiones de cada método.
7. Realizar prueba de Tukey, para determinar cuáles son los grupos con diferencias significativas, para determinar el más y menos efectivo en llegar a la lisis celular.

## VII. RESULTADOS

### A. Crecimiento de la levadura

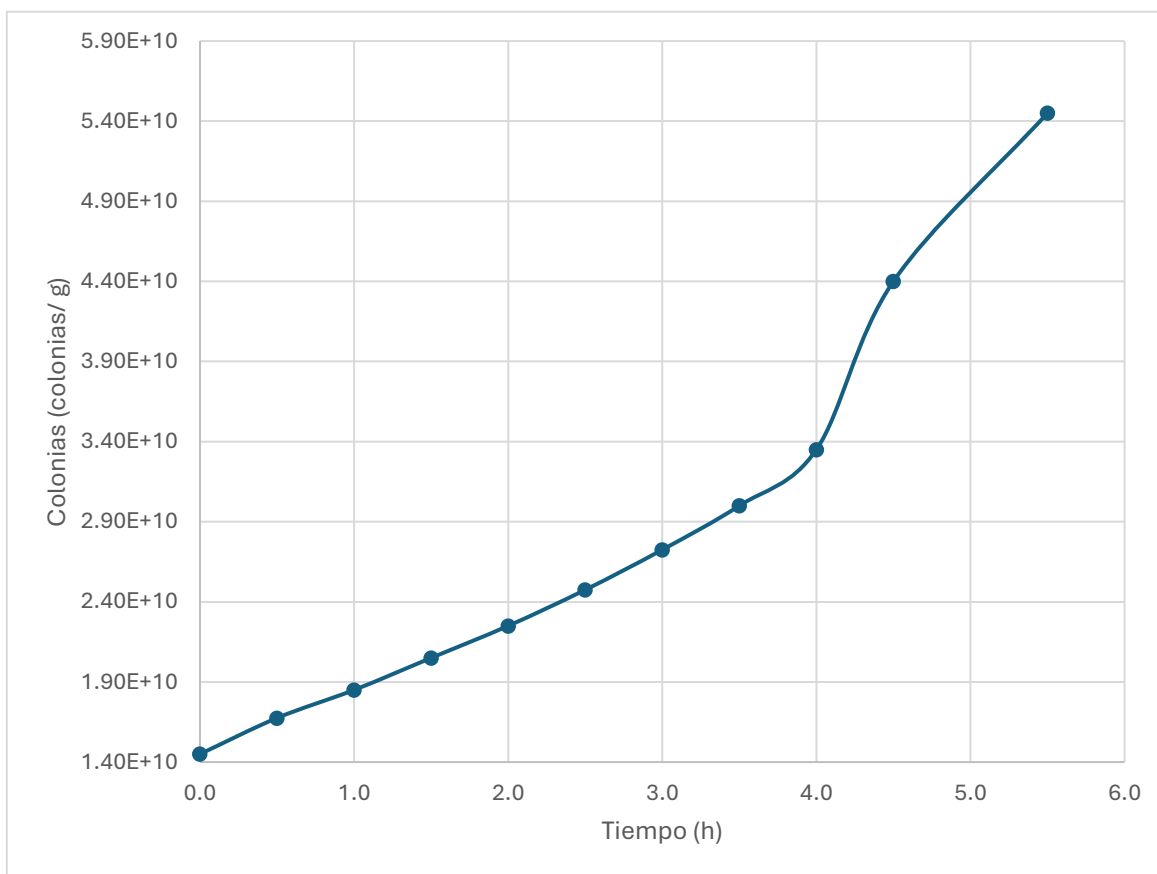
**Cuadro 1.** Datos de concentración y sustrato de las levaduras en la curva de crecimiento

Muestra	Tiempo (h)	Concentración (cél/g)	Concentración de sustrato (% m/v)	Velocidad específica de crecimiento
0	$0.0 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$1.21E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$9.435 \pm 5 * 10^{-4}$	N/A
1	$0.5 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$1.40E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$8.67 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.288 \pm 1.2 * 10^{-3}$
2	$1.0 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$1.54E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$8.23 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.199 \pm 1.2 * 10^{-3}$
3	$1.5 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$1.71E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$7.71 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.205 \pm 1.2 * 10^{-3}$
4	$2.0 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$1.88E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$7.18 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.186 \pm 1.2 * 10^{-3}$
5	$2.5 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$2.06E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$6.69 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.191 \pm 1.2 * 10^{-3}$
6	$3.0 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$2.27E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$6.21 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.192 \pm 1.2 * 10^{-3}$
7	$3.5 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$2.50E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$5.72 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.192 \pm 1.2 * 10^{-3}$
8	$4.0 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$2.79E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$5.26 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.221 \pm 1.2 * 10^{-3}$
9	$4.5 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$3.67E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$4.87 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.545 \pm 1.2 * 10^{-3}$
10	$5.5 \pm 8.33 * 10^{-5}$	$4.54E+13 \pm 2.79 * 10^{-1}$	$4.11 \pm 5 * 10^{-4}$	$0.214 \pm 1.2 * 10^{-3}$

Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtienen los resultados de concentración celular utilizando el método de conteo en la cámara de Neubauer. La concentración de sustrato obtuvo por análisis de HPLC.

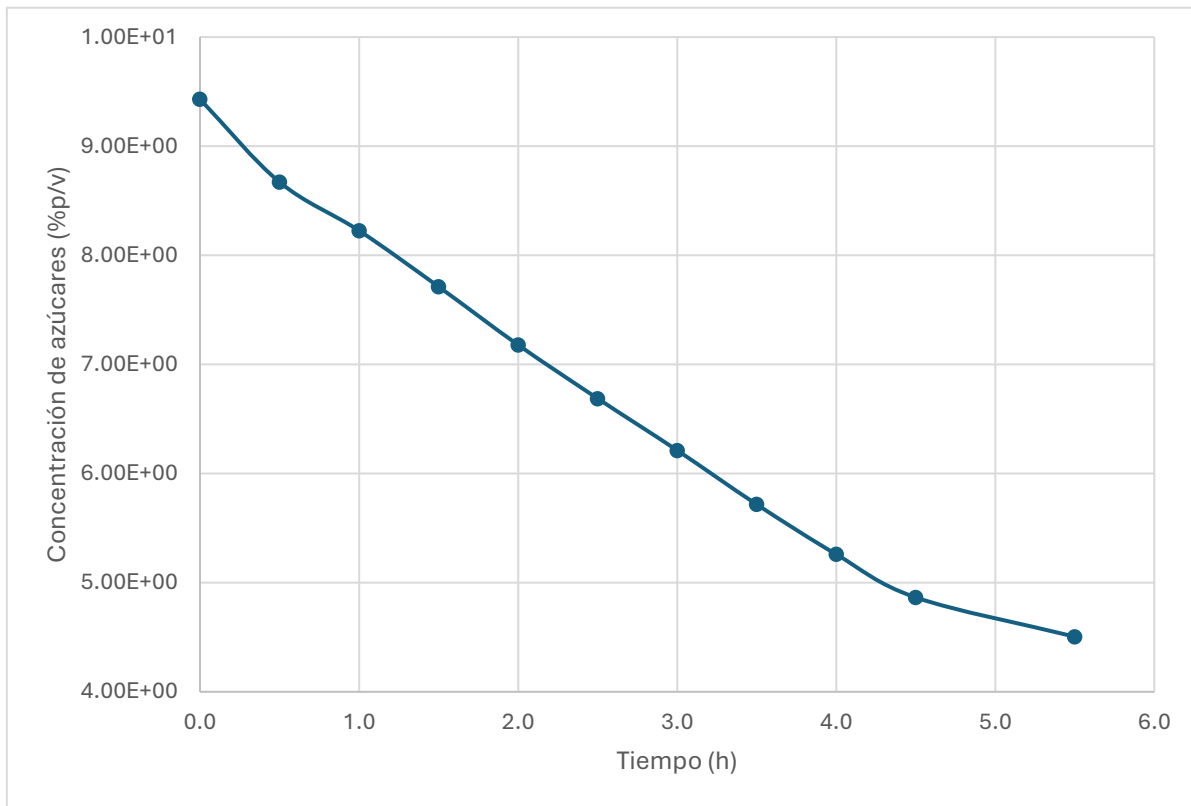
**Figura 10 . Concentración de células con respecto al tiempo**



Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtiene el conteo de colonias partiendo de la cuenta obtenida en la cámara de Neubauer, según se observan en el cuadro 5. El dato representado en la gráfica se obtiene a partir del cálculo 1. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos.

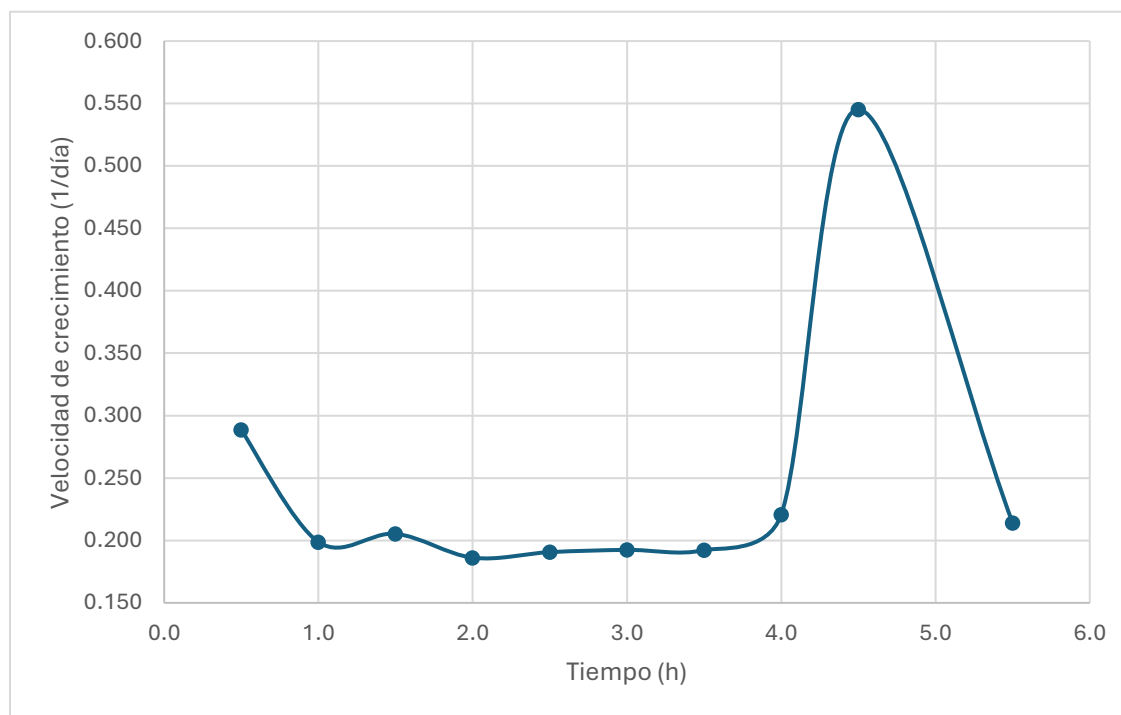
**Figura 11.** *Concentración del sustrato con respecto al tiempo*



Fuente: elaboración propia.

NOTA: Se utilizan los datos del consumo de sustrato a partir de los análisis de HPLC realizados para las muestras obtenidas de la curva de crecimiento. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos.

**Figura 12.** Velocidad de reacción de propagación de levaduras



Fuente: elaboración propia.

NOTA: Se utilizan los datos de concentración de microorganismos y el diferencial de tiempo para el cálculo de los datos del eje Y, según se observa en el cálculo 2. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos.

**Cuadro 2.** Concentraciones iniciales y finales durante proceso de propagación de biomasa, con valores respectivos de etanol

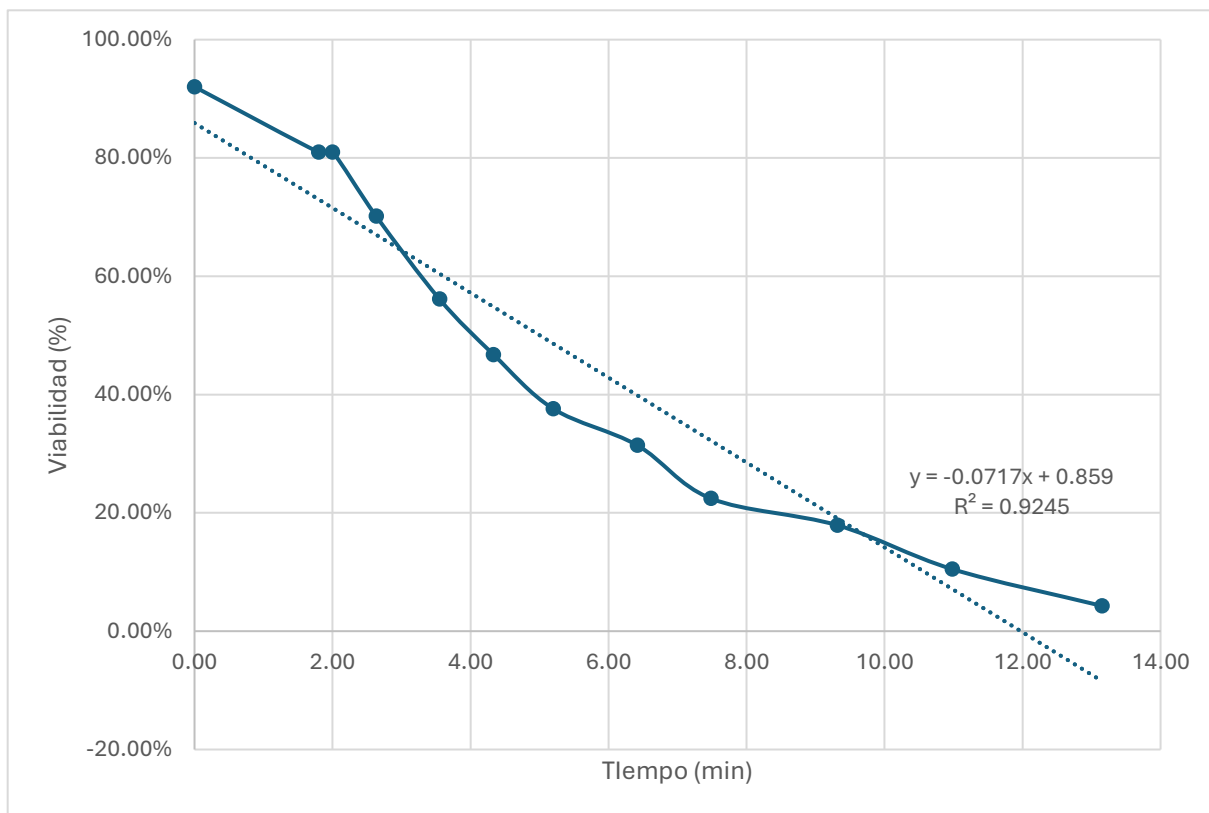
Volumen (L)	Concentración inicial de células (g/g)	Concentración final de células (g/g)	Viabilidad celular (%)	Producción de etanol (% m/m)
0.10	$6.53 \cdot 10^{10} \pm 0.78$	$1.20 \cdot 10^{11} \pm 0.78$	$99.50 \pm 0.025$	$0.0154 \pm 0.0005$
0.35	$5.68 \cdot 10^{10} \pm 0.86$	$1.56 \cdot 10^{11} \pm 0.86$	$99.23 \pm 0.025$	$0.0562 \pm 0.0005$
1.00	$1.13 \cdot 10^{10} \pm 1.14$	$2.35 \cdot 10^{12} \pm 1.14$	$99.79 \pm 0.025$	$0.0845 \pm 0.0005$
4.00	$3.15 \cdot 10^{10} \pm 1.68$	$8.13 \cdot 10^{13} \pm 1.68$	$98.68 \pm 0.025$	$0.388 \pm 0.0005$
85.00	$7.24 \cdot 10^{12} \pm 2.19$	$9.14 \cdot 10^{15} \pm 2.19$	$98.77 \pm 0.025$	$0.796 \pm 0.0005$

Fuente: elaboración propia.

Nota: Los resultados de las concentraciones iniciales y finales de levaduras según el volumen de la fase de propagación, se obtienen a partir del cálculo 1.

## B. Lisis por cambios de temperatura

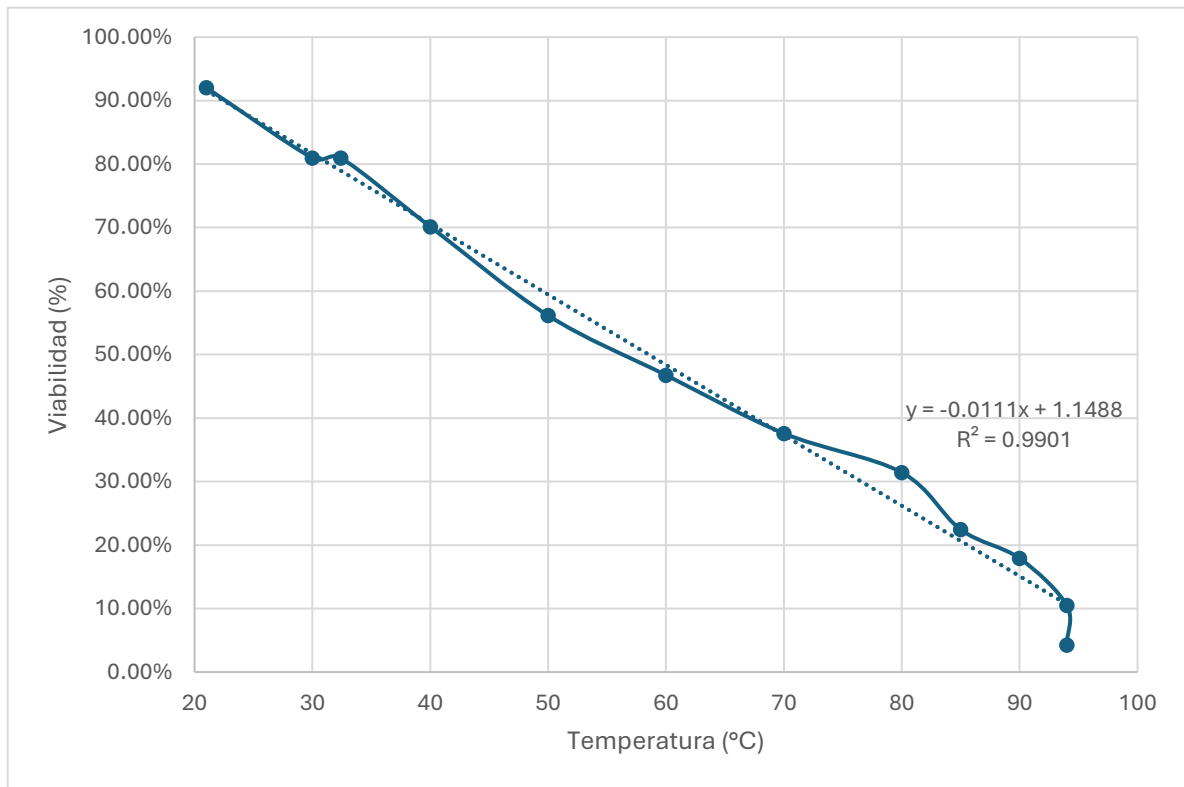
**Figura 13.** Viabilidad por cambios de temperatura en relación al tiempo



Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtienen los datos de viabilidad del cuadro 67, obtenidos a partir del cálculo 4. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

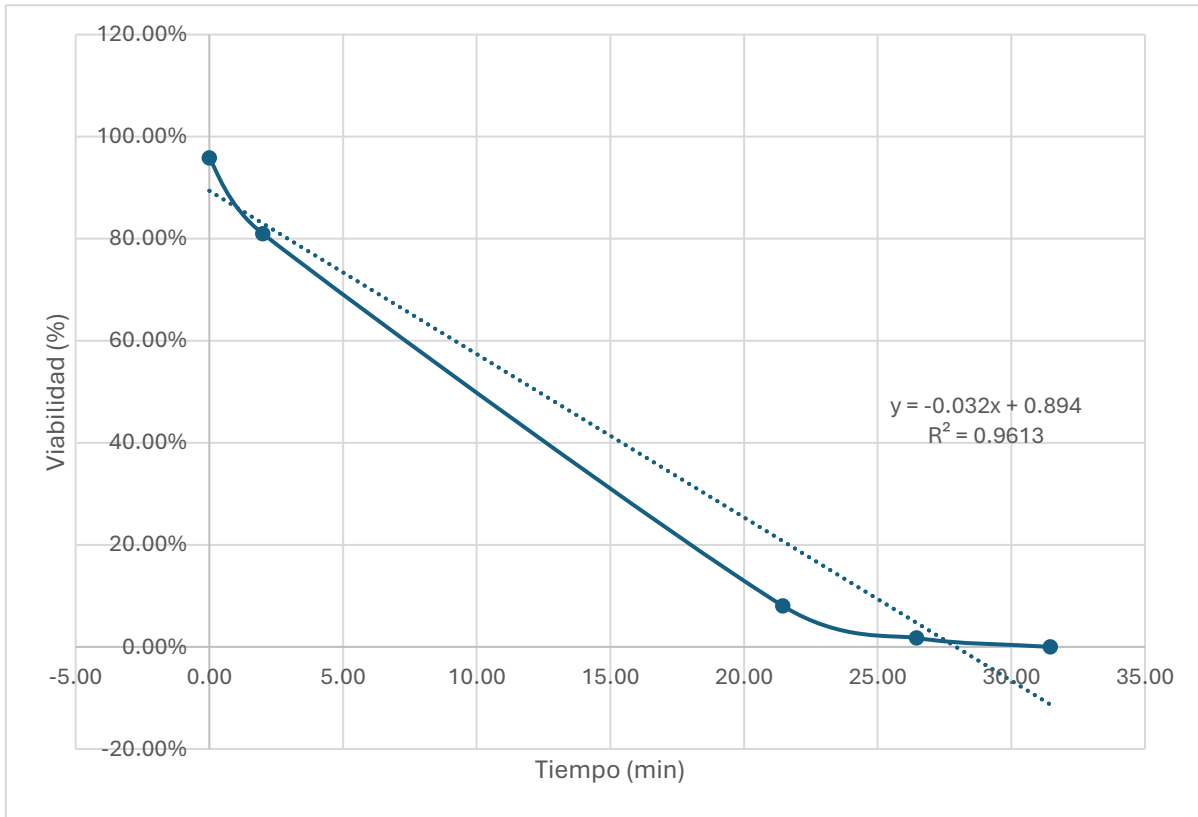
**Figura 14.** Viabilidad según temperatura del medio



Fuente: elaboración propia.

Nota: Se obtienen los datos de viabilidad a partir del cuadro 67, utilizado el cálculo 4. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

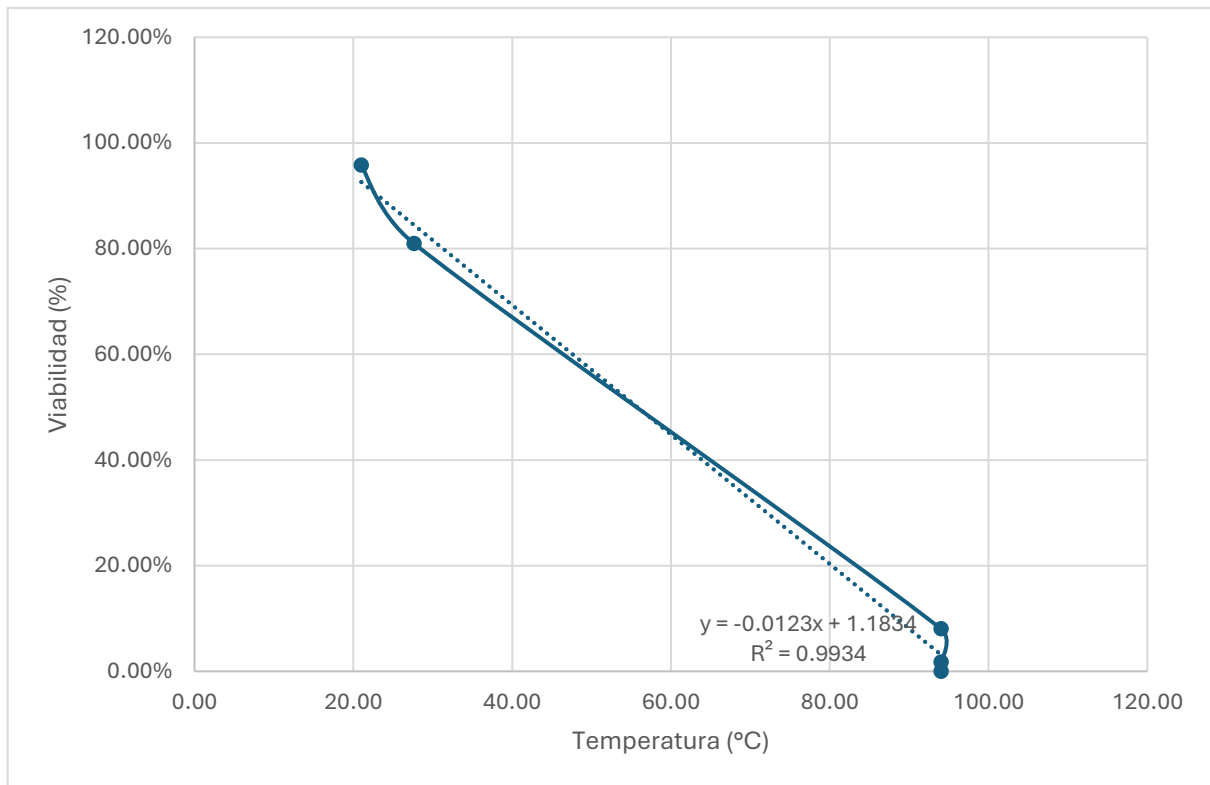
**Figura 15.** Viabilidad según tiempo de ebullición



Fuente: elaboración propia.

Nota: Se utilizan los datos de viabilidad y tiempo del cuadro 68, basándose en el cálculo 4. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

**Figura 16.** Viabilidad por temperatura de ebullición

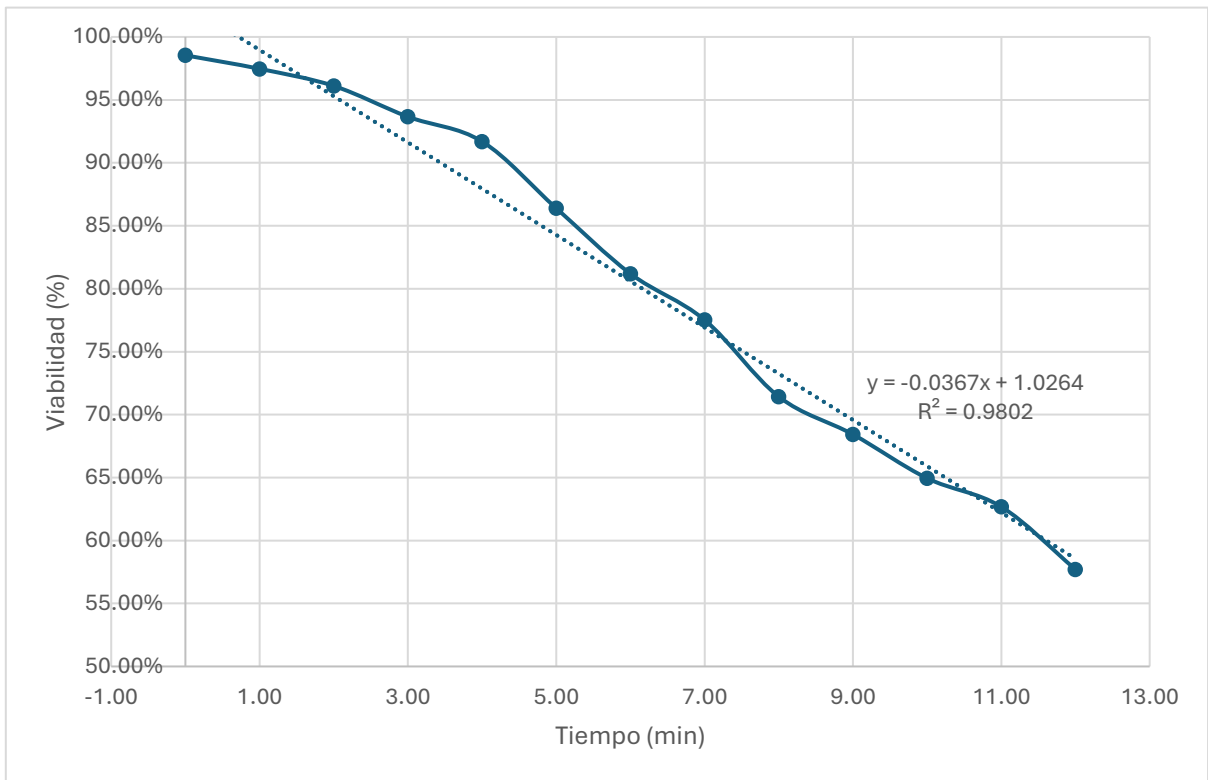


Fuente: elaboración propia.

Nota: Se obtienen los datos de tiempo y viabilidad a partir del cuadro 68, basándose en el cálculo de viabilidad 4 del documento. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

### C. Lisis mecánica

**Figura 17.** Viabilidad según lisis mecánica

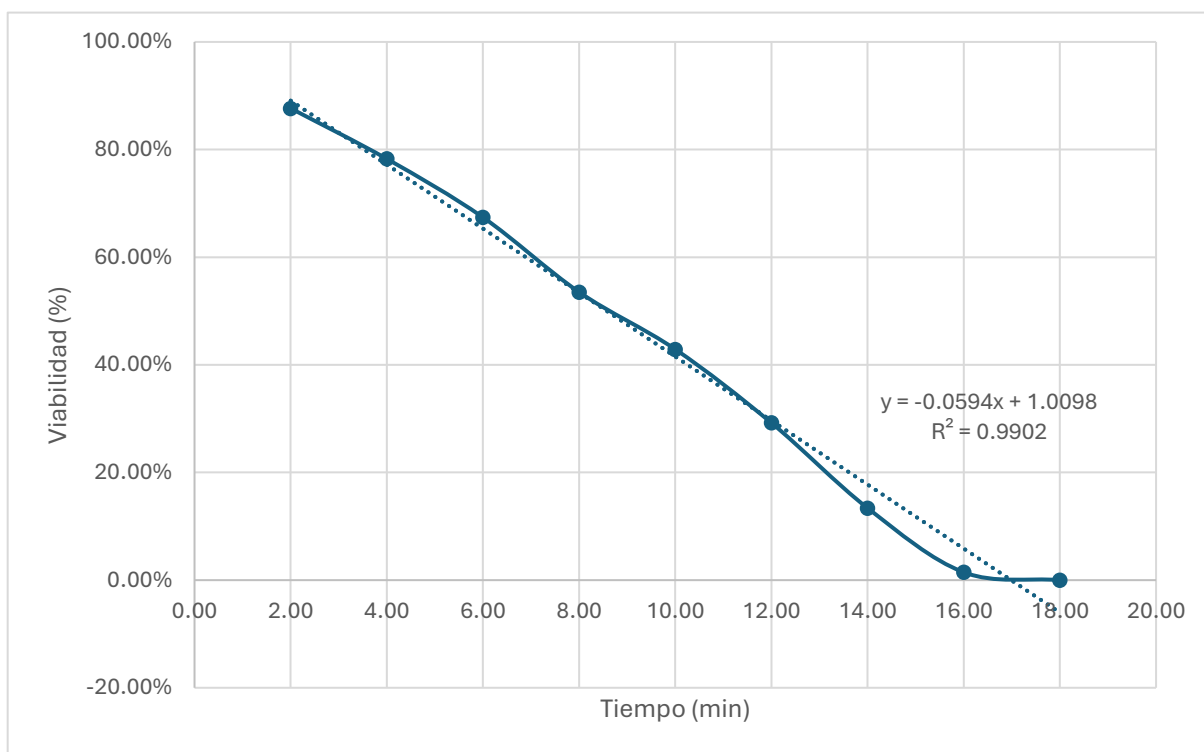


Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtienen los datos de viabilidad celular del cuadro 69, utilizando el cálculo 4 para la viabilidad. Se utilizó una agitación con las navajas del equipo de 11000 rpm. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

## D. Hidrólisis ácida

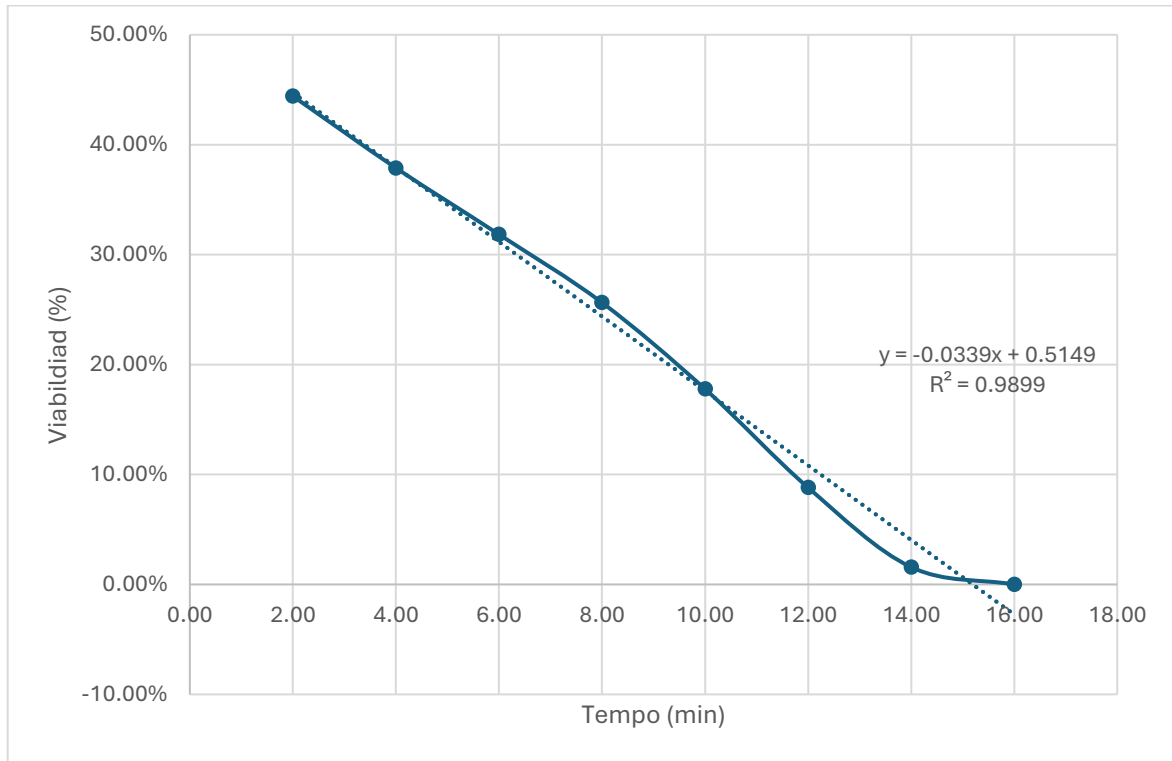
**Figura 18.** Viabilidad por hidrólisis ácida a 0.5 M



Fuente: elaboración propia.

Nota: se presenta la relación entre la viabilidad celular y tiempo de operación obtenidos del cuadro 61. La viabilidad se obtiene a partir del cálculo 4. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

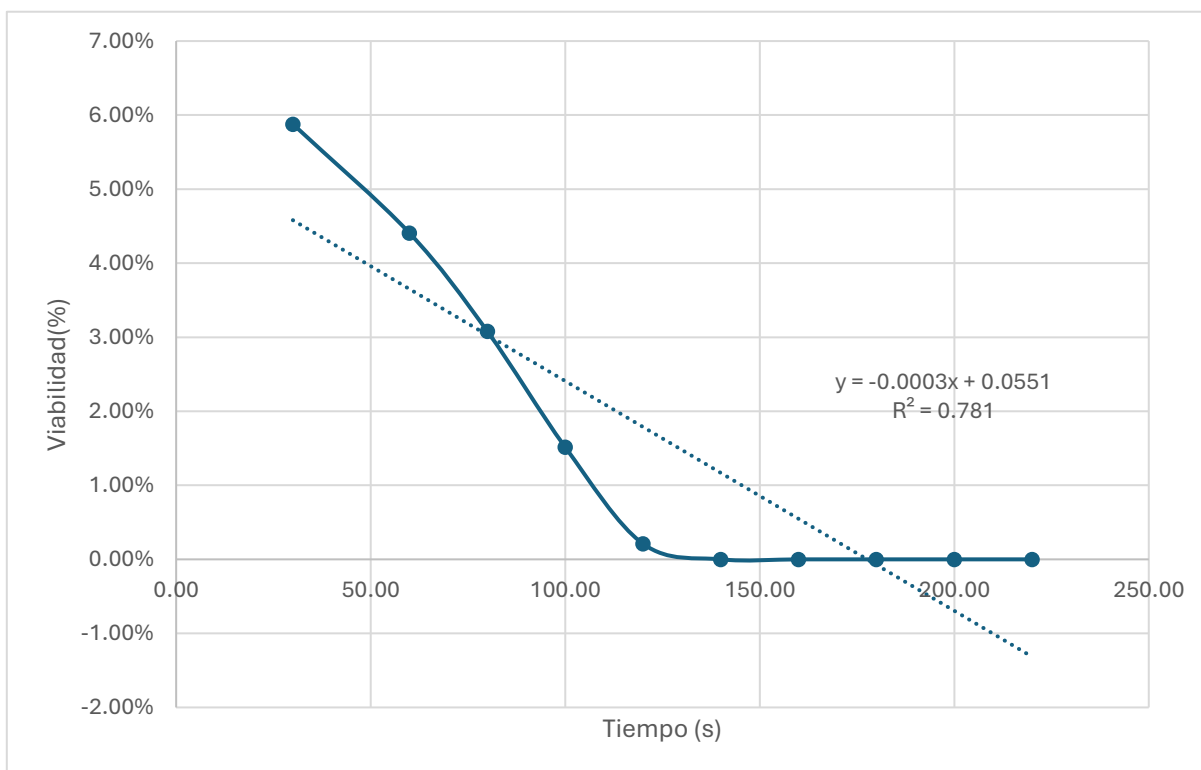
**Figura 19.** Viabilidad por hidrólisis ácida a 1 M



Fuente: elaboración propia.

Nota: se presenta la viabilidad celular y tiempo de reacción obtenidos del cuadro 62. La viabilidad se obtiene a partir del cálculo 4. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

**Figura 20.** Viabilidad por hidrólisis ácida a 1.5 M

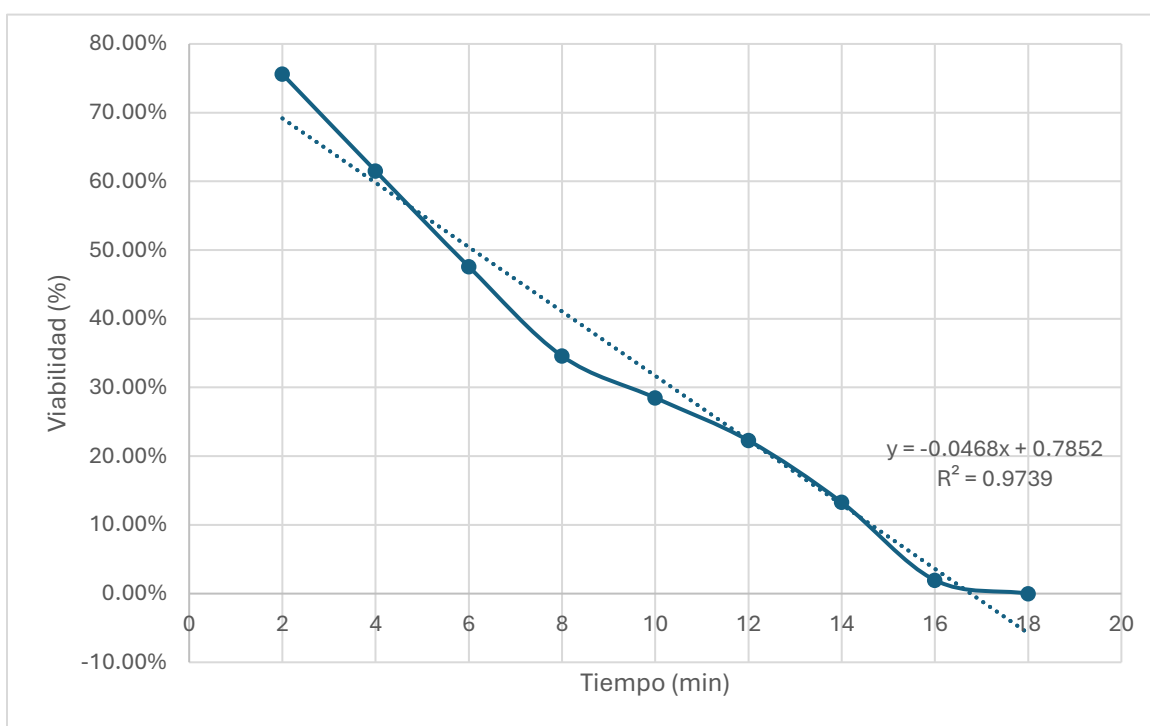


Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtienen los datos de viabilidad y de tiempo de reacción a partir del cuadro 63, utilizando el cálculo 4 para obtener la viabilidad. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

## E. Hidrólisis básica

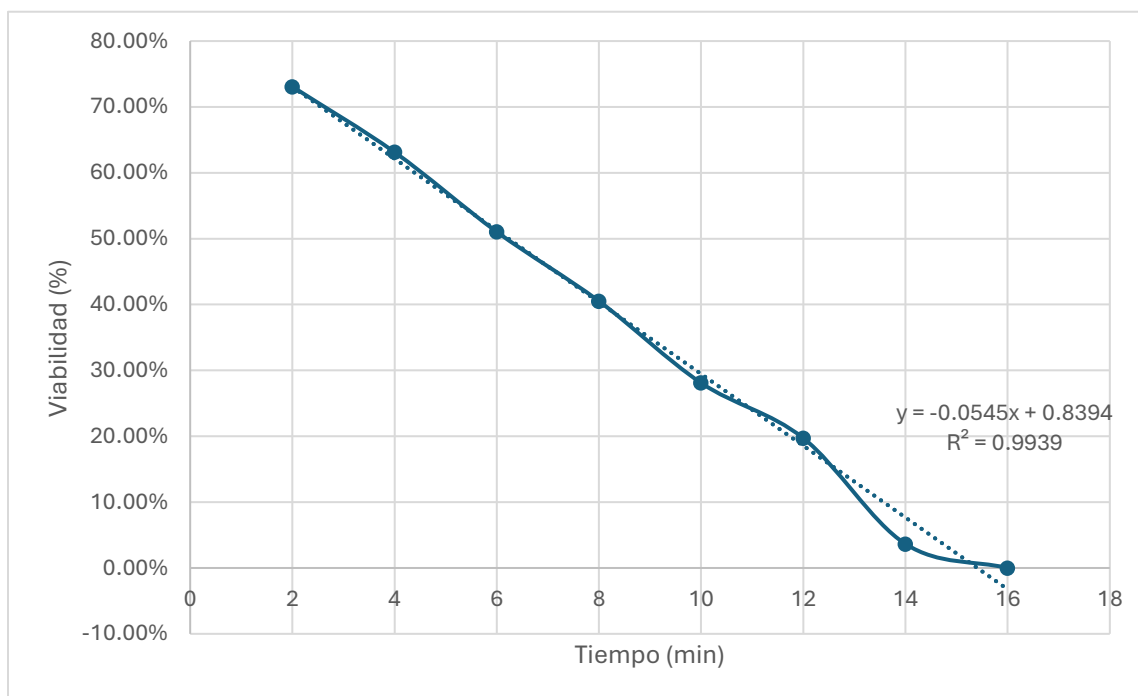
**Figura 21.** Viabilidad por hidrólisis básica a 0.5 M



Fuente: elaboración propia.

Nota: se grafican los datos de viabilidad celular y el tiempo de reacción necesario a partir de los datos del cuadro 64, basándose en el cálculo 4, para la obtención de la viabilidad. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

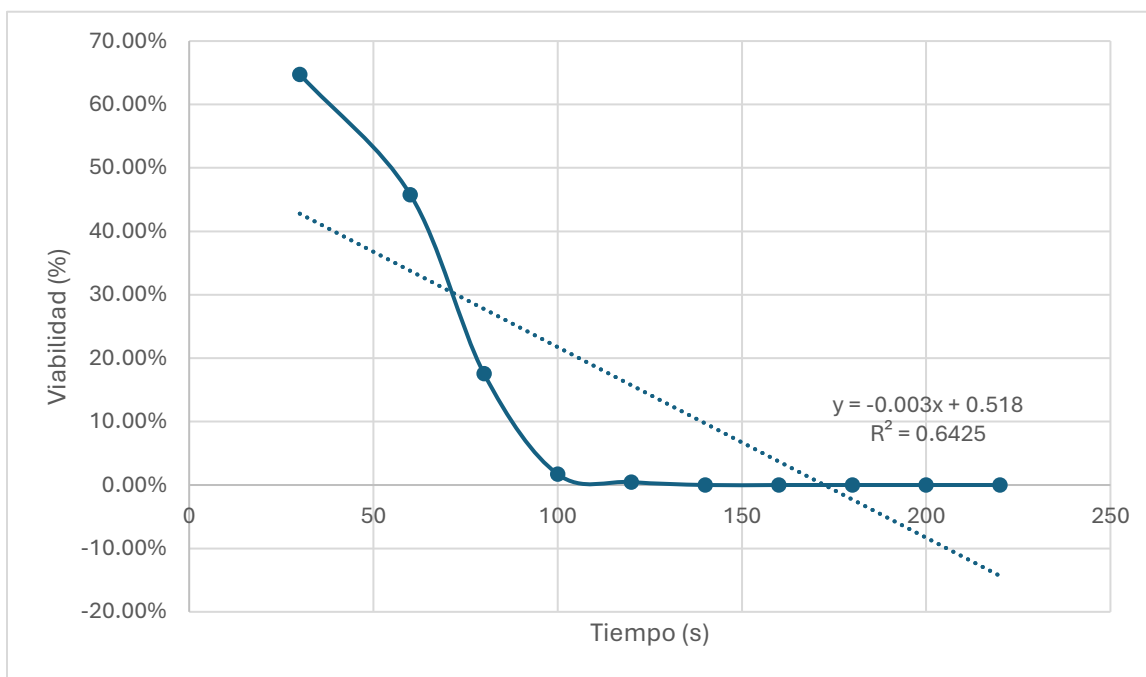
**Figura 22.** Hidrólisis básica a 1 M



Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtiene la relación de la viabilidad con el tiempo de reacción basado en el cuadro 65. La viabilidad es calculada por el cálculo 4. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

**Figura 23.** *Hidrólisis básica a 1.5 M*



Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtiene la relación entre la viabilidad obtenida, por el cálculo 4, y el tiempo de reacción del cuadro 66. Los puntos representan los datos experimentales obtenidos. Además, se observa la línea estadística suavizada obtenida con Microsoft Excel, así como su ecuación y el  $R^2$  asociado.

**Cuadro 3. Resumen estadístico de métodos de lisis**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Método analizado</b>	<b>Interpretación</b>
Valor p	$3.729 * 10^{-22}$	Todos los métodos	Existe diferencia significativa entre grupos comparados
Valor F	981.947	Todos los métodos	Existe alta variabilidad entre grupos comparados
Valor crítico en prueba de Tukey	0.0585	Todos los métodos	Diferencia mínima significativa entre grupos
Medias representativas de métodos de lisis significativamente diferentes	96.11 %	Lisis mecánica	Significativamente poco eficaz
	44.45 %	Hidrólisis ácida 1 M	Efectividad media entre los grupos
	0.47 %	Hidrólisis básica 1.5 M	Significativamente más eficaz
	0.21 %	Hidrólisis ácida 1.5 M	Significativamente más eficaz

Fuente: elaboración propia.

Nota: se presentan los datos relevantes de los análisis estadísticos realizados. Estos se basan en los resultados presentados en los cuadros 70 y 71, utilizando los cálculos 9 y 10. Además, se determinan los métodos significativamente diferentes al resto, en donde se definen los métodos más y menos eficientes.

## F. Extracto de levadura final

**Cuadro 4.** *Extracto de levadura obtenido*

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad obtenida</b>
Extracto de levadura	$121.5421 \pm 5 \cdot 10^{-5}$ g
Nitrógeno total	$5.15 \pm 5.24 \cdot 10^{-3}$ % m/m
Proteína	$38.85 \pm 1.02 \cdot 10^{-2}$ % m/m

Fuente: elaboración propia.

Nota: se obtiene la cantidad de extracto de levadura total obtenido durante el proceso de propagación de biomasa. Se presenta el dato del nitrógeno total en el extracto de levadura obtenido a partir de análisis realizados con el equipo Hach. Además, se presenta la concentración de proteína, basado en el cálculo 5, el cual relaciona el porcentaje de nitrógeno en las proteínas para determinar el contenido de proteínas totales en el producto.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la presente investigación, se inició con el aislamiento de la levadura seleccionada a partir de un inóculo de levadura comercial. En esta levadura, se encontraron más de una cepa de levadura, por lo que el aislamiento de la cepa seleccionada se determinó necesario. A partir de esta, se inició el proceso de propagación de la levadura, iniciando con la cepa aislada en una placa de agar papa dextrosa.

Al llegar a dos repeticiones de un litro con la cepa determinada, se obtuvo la curva de crecimiento de esta. Los resultados de esta, se observan en el cuadro 1. La relación entre el tiempo y el crecimiento de la levadura, se encuentra en la figura 10, en donde se observan las diferentes fases de crecimiento de la curva. En la primera hora de las mediciones, se observa la fase de adaptación, en donde no se obtiene un crecimiento representativo para el aumento de concentración. A pesar de esto, se determina que no se tiene una fase de adaptación notoria, puesto que las levaduras ya estaban adecuadas al medio, al haber iniciado con volúmenes menores y estos se fueron escalando hasta llegar al volumen de 1 L de medio. Por lo tanto, la fase de adaptación de la levadura no se define claramente en la gráfica.

Naturalmente, seguido de la fase de adaptación, se observa la fase exponencial, la cual se mantiene entre la hora 1 y la 4 después de la inoculación inicial de este medio. En esta se observa una tendencia de aumento más clara, en donde la pendiente se vuelve ligeramente más pronunciada y, por lo mismo, acelerada. A partir de la cuarta hora, se observa un aumento en la pendiente de los datos obtenidos de las últimas dos mediciones. Se establece un cambio en la tendencia, de lineal para la fase estacionaria a una tendencia exponencial igualmente en aumento. Esto puede indicar que, después de la sexta hora de mediciones se mantiene la fase estacionaria. Este comportamiento se conserva, siempre que haya concentración suficiente de sustrato en el medio. Tomando en cuenta, según la figura 11, que aún hay suficiente sustrato después de la hora 6, se determina que las levaduras mantienen su crecimiento en la fase estacionaria.

Con respecto a consumo de sustrato del medio, se determina una tendencia lineal negativa, en donde no se llega a consumir todo el sustrato en el tiempo determinado para las mediciones de la curva de crecimiento. A pesar de que se ve esta tendencia, no coincide directamente con las fases de crecimiento de levadura. Por el contrario, no se observa una diferencia en la tendencia del consumo del azúcar con respecto al tiempo, como se observa en la figura 11, con el crecimiento de la biomasa. Incluso con esta tendencia, se confirma que conforme crece y aumenta la biomasa, la concentración de azúcar disminuye, por lo que se demuestra que estas variables son indirectamente proporcionales. Por lo mismo, también se respalda el medio formulado para esta parte de la experimentación. Esto, puesto que la levadura pudo crecer con un buen rendimiento, con la fuente de azúcar y nitrógeno determinada.

Al realizar los cálculos para la determinación de la velocidad de reacción de propagación de biomasa. En la figura 12, se observa que justo después de las 4 horas pasadas después de la inoculación de la levadura en el medio, se observa el punto más alto de la gráfica. Este determina justo el inicio de la fase estacionaria, es decir la velocidad más alta de reacción durante el tiempo de toma de muestras para esta parte de la experimentación. Esta gráfica es importante, puesto que es posible determinar el punto donde más biomasa se genera, lo cual es el objetivo en esta parte del proceso. Esto significa que, en este punto, la fermentación no se enfoca en la producción de etanol, sino que en la propagación de la levadura (Téllez, et al., 2012).

En relación a los datos de concentraciones de células en las diferentes etapas del proceso de propagación, según se observa en el cuadro 2, se determina un crecimiento constante en cada paso. Por supuesto, al aumentar el volumen del medio, la concentración inicial de levaduras se reduce, en comparación de la final del volumen anterior, al aumentar la cantidad en la que se diluye la biomasa. Por lo tanto, al llegar al volumen final de 85 L, la concentración es aún más alta, especialmente tomando en cuenta el gran volumen. A partir de esto, se determina un rendimiento alto de propagación de la biomasa, especialmente tomando en cuenta la concentración de levadura inicial en apenas 100 mL de medio.

Al hablar de la producción de etanol en el proceso de propagación, las cantidades obtenidas fueron muy bajas, presentadas en el cuadro 2. Por lo tanto, se considera que es un

porcentaje final descartable, en comparación con el porcentaje de biomasa generado durante el proceso de crecimiento. A pesar del gran volumen final para la propagación de las levaduras, no se obtienen grandes cantidades de etanol, especialmente por el tiempo de incubación determinado. Por lo mismo, no se toma en cuenta un decrecimiento en la viabilidad celular por presencia de etanol en el medio, el cual según algunas fuentes puede afectar este factor importante en la investigación. Igualmente, esto es apoyado por la obtención de la viabilidad celular en cada fase de propagación, las cuales no descienden del 98 % (Vásquez & Dacosta, 2007).

Basado en ciertos estudios publicados acerca de la lisis celular, específicamente de levaduras, se han determinado los métodos de cambios temperatura, lisis mecánica e hidrólisis ácida como los más comunes. Además, estos pueden ser escalados de manera efectiva para obtener los resultados deseados. Por lo tanto, en este estudio se eligieron los cuatro métodos descritos en la metodología para comprobar su efectividad con una cepa seleccionada a partir de levadura liofilizada comercial.

Al iniciar con el estudio de los métodos de lisis, se determinaron las curvas de la fase de muerte de las levaduras con respecto al tiempo. Como primer método, se tomaron en cuenta los porcentajes de viabilidad promedio de las tres repeticiones realizadas para el método de lisis por cambios de temperatura. La relación entre estas variables, se presenta en la figura 13 en donde se encuentra una tendencia negativa. Esto quiere decir, que la viabilidad celular sí se redujo con respecto al tiempo. Además, se observa que la correlación de Pearson es de 0.9245, lo cual indica que existe una variabilidad en la recta negativa. Por supuesto, es evidente que la viabilidad no baja de manera perfectamente lineal, sino que una tendencia ligeramente exponencial negativa en su mayoría.

En este caso, la viabilidad no llegó al 0 %, al llegar a la temperatura de ebullición del agua. Lo cual indica que no se dejó suficiente tiempo a esta temperatura para llegar a una viabilidad nula. Esto se confirma también puesto que al sembrar una muestra diluida en 1:100 de la última medición, aún se observó presencia de colonias de levadura (figura 43 y 44). En esta, se observa una alta concentración de colonias de levaduras viables, en la mediciones anteriores a la última, así como en la extraída que fue expuesta a la

temperatura de ebullición. Puesto que no se llegó a la viabilidad esperada, se realizó un estudio específicamente del comportamiento a temperatura de ebullición.

Por otra parte, es posible determinar que, al llegar a cierta temperatura, en este caso a alrededor de los 3 minutos la viabilidad empieza a bajar significativamente. Como se observa en la figura 13 se obtiene la relación de la temperatura con la viabilidad celular. En esta gráfica, se determina también que alrededor de los 40 °C la viabilidad baja, lo cual coincide con los datos de la figura 14. Es posible que al estudiar una sola temperatura, entre 40-60 °C, la viabilidad pueda llegar al 0 %. Por supuesto, eso implicaría un mayor tiempo de exposición a la temperatura determinada, para llegar a la viabilidad buscada. Además, esto está directamente ligado a la cantidad de levadura con la que se trabaje, puesto que mientras mayor sea la cantidad, mayor es el tiempo requerido para llegar a una lisis completa (Uribe, 2007).

Para determinar el tiempo necesario de exposición a altas temperaturas para llegar a una viabilidad nula, se realizó un experimento únicamente determinando la viabilidad celular a temperatura de ebullición del agua. En este caso, tomó 23 minutos en llegar a 96 °C para la ebullición y la viabilidad aún era mayor a 0 %. Los resultados de esto, se grafican en la figura 15, en los cuales se relaciona el tiempo expuesto a altas temperaturas con la viabilidad. A partir de esta, se establece que la cepa de levadura estudiada, llegó a una lisis completa después de 15 minutos a temperatura de ebullición. El resultado se confirma con la siembra de la muestra de este experimento (figura 39), en donde ya no se observa presencia de colonias después de este tiempo. Por supuesto, el tiempo de lisis con este método, puede variar dependiendo de la cepa de levadura estudiada, pues algunas tienden a ser más resistentes a altas temperaturas que otras (Mejía, et al., 2016).

Con respecto al segundo método estudiado, la lisis mecánica, se determina que no fue efectivo para el objetivo buscado. Según se observa en la figura 17, la viabilidad no llega a bajar más del 50 %, incluso con una alta potencia y navajas afiladas. Esto puede deberse a que las células son demasiado pequeñas para ser rotas por el sistema afilado. También, si se diluye una pequeña cantidad de la pasta de levadura en una mayor cantidad de agua, se reduce la capacidad de romper las células al tener una mayor área de contacto con el agua y no

directamente con las células. Por lo tanto, este método no representa una fuente para llegar a viabilidades de 0 %, para llegar al objetivo de la investigación. De igual manera, las placas sembradas con las muestras de este método, tienen crecimiento de colonias, incluso en la última medición.

Por supuesto, esto no implica que otros métodos de lisis mecánica no sean efectivos, por el contrario, es posible establecer que el utilizado específicamente no lo es. En esta instancia, una lisis de homogeneización con perlas, o bien, por alta presión puede considerarse más eficientes para llegar a una lisis completa. En el caso del uso de las perlas de vidrio, la ruptura de las células se provoca por la fricción y colisión con las perlas. Por lo tanto, la viabilidad puede bajar más rápido que con el método utilizado. Igualmente, al exponer las levaduras a alta presión, las células no soportan las condiciones y llegan a una lisis celular completa (Löffler, 2009).

Al estudiar la viabilidad celular al exponerlas a la hidrólisis ácida con la solución de ácido clorhídrico a 0.5 M, se obtienen resultados del 0 % después de 18 minutos de exposición a la solución. La relación entre el tiempo de exposición y la viabilidad de las células se encuentra en la figura 18. En esta gráfica se observa que la viabilidad de las células inicia su descenso desde los primeros dos minutos de exposición al método. Se determina el tiempo exacto para que todas las células llegen a la lisis total con esta concentración específica de la solución. Se observa además, una tendencia lineal negativa con una correlación de Pearson de 0.9902, por lo que los datos obtenidos no tienen variabilidad significativa con respecto al tiempo.

De igual manera, al observar las placas inoculadas con las células expuestas al método, se determina que si fue eficiente para la lisis celular. Esto debido a que conforme más tiempo de exposición, se ve una clara tendencia en la reducción de las colonias presentes en las placas. En comparación con los métodos anteriores, se observa una tendencia más marcada en el descenso de la viabilidad con respecto al tiempo, sin ningún dato atípico.

Al subir la concentración de la solución de ácido clorhídrico a 1 M, se observan resultados parecidos que con la concentración menor determinada. Se encuentra diferencia en el tiempo de exposición a la solución, pues se establece que se necesitan de dos minutos

menos para llegar a una lisis completa. El método se considera eficiente, pues lleva las células a romper su pared, pero no demuestra una diferencia significativa entre las concentraciones de 0.5 M y 1 M. De igual manera, ambas concentraciones utilizadas son eficientes y requieren de un tiempo menor a 20 minutos para llegar al objetivo.

Al aumentar la concentración de la solución a 1.5 M del ácido, se determina la concentración más eficiente para completar la hidrólisis ácida establecida. En esta, el tiempo para llegar a la lisis completa de las levaduras fue de apenas segundos. En este caso, la solución es fuerte y las células no soportaron las condiciones y se rompieron mucho más rápido que en los casos anteriores de la hidrólisis ácida. Esto mismo se evidencia en la siembra de las muestras en las placas de agar, pues no se encuentra ningún crecimiento de colonias en ningún punto de la placa (figura 45). La efectividad de la solución con concentración más alta para llegar a lisis se puede deber a su capacidad y potencia para provocar la ruptura de la célula. Además, los ácidos tienden a tener una mayor capacidad para disolver la pared celular, por lo que las células también llegan a su muerte más rápido que con concentraciones más bajas (Otero, 2010).

De igual manera, se realizó el estudio para determinar el comportamiento de las levaduras ante una hidrólisis básica. Este método no ha sido estudiado de manera amplia como lo ha sido con la hidrólisis ácida. Esto puede deberse a que las células tienen una pared celular, que tiene a debilitarse de manera más eficiente ante condiciones de un pH ácido. Además, los ácidos tienen la capacidad de desnaturalizar proteínas y otros componentes de manera controlada. Esto es particularmente útil cuando se busca la extracción de compuestos específicos sin causar una degradación considerable. Para este estudio, se buscó comparar la hidrólisis ácida con la básica y determinar si realmente es más eficiente la ácida en comparación con la utilización de las bases (Crueger, 1990).

La hidrólisis básica con una solución de hidróxido de sodio a 0.5 M, demuestra que tiene la capacidad de lisar las células hasta llegar a una viabilidad de 0 %, representada en la figura 21. Al igual que con la hidrólisis ácida con una solución de la misma concentración, se obtiene el mismo tiempo necesario de exposición, 18 minutos para llegar a una lisis completa de las células. Se tiene una tendencia lineal negativa con respecto al tiempo. En comparación

con la hidrólisis ácida, la viabilidad no baja tan rápido con la hidrólisis básica a pesar de llegar a una viabilidad nula en el mismo tiempo de exposición al método.

Al utilizar una concentración de 1 M para realizar la hidrólisis básica, igualmente el tiempo de exposición a la base se reduce a 16 minutos. En esta se tiene una tendencia lineal caso perfecta, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.9939, según se observa en la figura 22. Únicamente los últimos dos datos presentan pequeña diferencia con la tendencia que llevaba la viabilidad. Por lo tanto, se puede considerar como igualmente eficiente que la hidrólisis ácida realizada con una solución de la misma concentración.

Al utilizar la concentración de la solución básica de 1.5 M, se observa que llega a una viabilidad de 0 % incluso unos segundos antes que con la hidrólisis ácida. En este caso, se evidencia que la hidrólisis básica fue más eficiente que la ácida, si se compara el tiempo necesario de exposición. Al igual que con las soluciones ácidas, las placas sembradas de las muestras de la hidrólisis básica, son evidencia de que la viabilidad de las células llega a ser nula al ser expuestas a estos métodos.

Cabe mencionar, que es posible que la hidrólisis básica realizada haya disminuido hasta una viabilidad del 0 %, debido a que las células de levadura pueden crecer de a una velocidad como la referenciada en la literatura, en condiciones más ácidas, es decir en pH bajo. Por lo tanto, la célula tiene menos posibilidades de sobrevivir en estas condiciones. Por lo mismo, se evidencia, especialmente en la hidrólisis realizada con la concentración de 1.5 M que puede llegar a ser igual o incluso más eficiente que la hidrólisis ácida (Amini y Botstein, 2008).

Al hacer el análisis estadístico de los métodos realizados para la lisis celular, se tomo de base dos minutos de tiempo de exposición de cada método para realizar la comparación entre ellos. Se determinó por el análisis de varianza que existe una diferencia significativa entre los resultados de cada método, puesto que el valor p obtenido es mucho menor que 0.05. De igual manera, el valor F obtenido determina que existe una alta variabilidad entre los grupos comparados. Por lo tanto, con estos resultados fue posible establecer los

métodos más y menos eficientes al realizar una comparación entre las medias de la viabilidad basado en la prueba de Tukey.

Se obtuvo el valor crítico para la prueba de Tukey el cual se determinó de 0.0585, lo cual se utilizó para establecer la diferencia mínima que debe existir entre cada diferencia entre las medias para ser considerada como significativamente diferente. Como resultado de esto, se determinó que los valores de la lisis mecánica, hidrólisis ácida con la solución de 1 M y las hidrólisis ácida y básica de 1.5 M, fueron los métodos que demostraron tener resultados significativamente diferentes al promedio.

En primer lugar, se analiza el resultado de la lisis mecánica, el cual tiene una media de 96.11 % de viabilidad. Por supuesto, esto implica que este fue el método con menos eficiencia para completar la lisis de las levaduras evaluadas. Por lo tanto se descarta su resultado como un método efectivo para su utilización para obtener la lisis de las células. De la mano de esta, se encuentra la hidrólisis ácida con una solución de 1 M, el cual presenta una media de 44.45 %, por lo que únicamente presenta una efectividad media para llegar a la lisis celular completa. Realmente no representa un resultado definitivo, al comparar con las medias de los métodos no seleccionados, presentadas en el cuadro 70.

Aparte, se determina que las hidrólisis ácida y básica con soluciones a concentración de 1.5 M, con medias de 0.21 % y 0.47 % respectivamente fueron determinadas como significativamente diferentes al resto de los métodos. Al analizar estas medias, se estableció que estos fueron los dos métodos más eficientes, al comparar la velocidad de bajar la viabilidad. Por lo tanto, se concluye que, estadísticamente estos fueron los más eficientes para llegar al objetivo de llegar a una lisis celular completa.

Al haber obtenido el extracto de levadura como producto final, se determinó una cantidad final de  $121.54 \pm 5 \cdot 10^{-5}$  g. Esto implica que hubo un gran crecimiento de biomasa en el proceso de propagación de la biomasa. Se comprueba que la nutrición y condiciones de incubación fueron ideales para cumplir el objetivo de obtención de biomasa para su transformación a extracto de levadura.

Adicionalmente, se analizó la composición de proteína en el extracto de levadura obtenido. Para esto, se realizó una solución con el extracto de levadura y se determinó la concentración de nitrógeno total en esta. A partir de esto, se obtuvo una concentración de  $5.15 \pm 5.24 \cdot 10^{-3}$  % m/m. Al utilizar la relación entre el nitrógeno contenido en las proteínas, se calculó una concentración de  $38.85 \pm 1.02 \cdot 10^{-2}$  % m/m.

Al comparar este valor con la teoría, se puede considerar en el rango bajo, pues se espera que el extracto de levadura contenga entre 40-60 % del peso seco. Esto puede deberse a que una gran parte de la proteína contenida en las células de levadura se concentra en la parte soluble de su contenido. Por lo tanto, al descartar el sobrenadante obtenido de la lisis de levadura posterior a la centrifugación, una parte de las proteínas fue descartado también. En algunos casos, el extracto de levadura puede ser obtenido del sobrenadante obtenido de la lisis para obtener una pasta de extracto de levadura. En este caso, se utilizó la biomasa de la levadura lisada, por lo que es evidente que el porcentaje de proteína es menor. A pesar de esto, queda cercano al porcentaje esperado de la proteína en el producto obtenido (Suárez, et al., 2016).

Al tomar en cuenta el porcentaje de proteína de un extracto de levadura comercial, para consumo, se determinó que el producto puede ser vendido bajo las mismas condiciones, al cumplir con los estándares establecidos, de un porcentaje de proteína entre 35-50 %. Al comparar con el estándar para su uso en laboratorio, las diferentes marcas que comercializan el producto mantienen el porcentaje de proteína en 66 %. Por lo tanto, el producto obtenido de la investigación, no podría competir directamente en esta área. Por esto, es recomendable el control de la proteína, según cada método evaluado en el estudio (Merck, 2024).

En este punto, es importante mejorar los procesos realizados, para evitar la desnaturalización de las proteínas y diferentes compuestos que se obtienen de las células de levadura. Esto, puede llegar a aumentar la pureza del producto, con lo cual es posible ampliar el uso que se le puede dar al producto final. Además, aumentaría la calidad del producto para su venta.

A partir de la comparación estos resultados, se determinó que los métodos de hidrólisis ácida y básica con soluciones de 1.5 M al haber obtenido viabilidades baja. Esto en comparación con los métodos realizados anteriormente, o incluso, el mismo método con las concentraciones de la solución más bajas. con un menor tiempo de exposición al método. Aparte, se encontró que la elección del método de lisis puede variar también, según la cantidad y cepa de levadura obtenida, causando variabilidad en los resultados. El análisis estadístico confirmó las diferencias significativas y determinó cuales fueron los métodos elegidos más eficientes para completar la lisis celular en el menor tiempo.

Por otra parte, se determinó que el método utilizado para la obtención del extracto de levadura como producto final, fue efectivo desde la propagación de la biomasa. En esta parte del proceso, la levadura aumento en un factor de  $1.19 \cdot 10^8$ , dando paso a una producción efectiva del producto final. Igualmente, los hallazgos proporcionados sobre los métodos evaluados, proporcionan una base sólida para futuras investigaciones sobre el tema.

## IX. CONCLUSIONES

1. Al realizar la comparación entre los métodos de lisis celular para la obtención de extracto de levadura, se determinó que los métodos de hidrólisis ácida y básica fueron los más efectivos. Esto se demostró al haber llegado a una lisis celular total a alrededor de dos minutos por exposición al método, con soluciones con concentraciones de 1.5 M.
2. Se obtuvo una propagación exitosa de la cepa de *S. cerevisiae* seleccionada para la obtención de extracto de levadura, con una masa total de  $121.5421 \pm 5 \cdot 10^{-5}$  g de extracto de levadura. El método de crecimiento y propagación propuesto demostró ser efectivo para la obtención de la biomasa requerida, tomando en cuenta la formulación utilizada en el medio de cultivo determinado.
3. Al evaluar de estadísticamente los resultados de los métodos de lisis estudiados, se determinó que la lisis mecánica fue la menos efectiva. A pesar de mantener las levaduras expuestas al estrés mecánico por más de 15 minutos, no se provoca una ruptura celular mayor del 50 % todas las células presentes en la muestra. Por el contrario, los métodos de hidrólisis ácida y básica con soluciones en concentración de 1.5 M, demostraron ser los más rápidos y efectivos en llegar a una lisis completa en alrededor de 2 minutos. Esto se demostró, pues la diferencia entre las medias de estos métodos fue mayor al valor crítico de la prueba de Tukey de 0.0585.
4. Se mantuvo una viabilidad superior al 98 % durante todo el proceso de propagación de la cepa de levadura, lo que garantiza una cepa viable para los estudios posteriores de lisis. Además, se demostró que las levaduras se adaptaron al medio preparado, al mantener su concentración en aumento conforme se aumentaron los volúmenes de medio. Las levaduras mostraron mantener su viabilidad, incluso después de la centrifugación para la eliminación del medio de cultivo utilizado previo al estudio de los métodos de lisis.

## X. RECOMENDACIONES

Existe la posibilidad de realizar un estudio específico a futuro de la formulación de un medio de cultivo, el cual tenga el potencial de aumentar el rendimiento de propagación de la levadura por un mayor tiempo de manera continua.

Tomando en cuenta que el método de lisis mecánica utilizado demostró no ser efectivo para lograr el objetivo establecido, se debe considerar un posible estudio específico de diferentes métodos mecánicos para evaluar su efectividad para llegar a una lisis completa.

Existe un potencial en el estudio de los tiempos de exposición requeridos para los diversos métodos de lisis celular evaluados, con mayores cantidades de levadura. Esto implica un estudio a una escala mayor a la previamente estudiada para parametrizar un posible escalamiento industrial.

Debido a que las cepas de levadura varían en sus características, es recomendable replicar este estudio posteriormente con diferentes tipos de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas de una fuente diferente.

Considerando los resultados individuales de cada método de lisis estudiado, hay posibilidad de mejora, a partir de un ajuste en los tiempos de exposición al método, así como las condiciones de operación de cada uno, para el posible aumento en la efectividad de los métodos ya estudiados.

Dado que el contenido intracelular de las levaduras es delicado, es recomendable añadir monitoreos de la integridad celular. Existe potencial de incluir un estudio específicamente de cuantificación de proteína del extracto obtenido, por cada método de lisis estudiado. De esta manera, se puede determinar el método que tenga la capacidad de evitar la desnaturalización de proteínas en mayor medida, utilizando este estudio como base.

Se puede considerar la combinación de diferentes métodos de lisis para aprovechar la ventaja de cada uno, con el fin de mejorar la efectividad del proceso. Con esto, también existe una potencial mejora en la calidad del extracto de levadura obtenido.

## XI. REFERENCIAS

- Aguilar, B., Solis, J., y Farncois, J. (2005). *Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la*. Obtenido de Universidad del Guadalajara: <https://www.redalyc.org/pdf/730/73000312.pdf>
- Amini, S., y Botstein, D. (2008). Influencia del genotipo y la nutrición en la supervivencia y el metabolismo de la levadura hambirenta. *Proc. National Academy of Science*.
- Araóz, J., Cárdenas, G., Ruiz, M., y Gusils, C. (2016). *Análisis comparativo de colorantes vitales en el estudio de la viabilidad de levaduras*. Obtenido de Repositorio Institucional CONICET: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/14984#:~:text=La%20viabilidad%20de%20la%20levaduras,metileno%2C%20que%20se%20utiliza%20convencionalmente.>
- Barnett, J., Payne, R., y Yarrow, D. (2000). *Yeast: Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bauer, M., Yuan, Y., y BD Bennett. (2006). Conservación de la respuesta metabólica a la iniciación de dos microbios divergentes. *Proc Natl ACAS Sci.* .
- Binaghi, M., Broni, A., Greco, C., Ronayne, P., y Valencia, M. (2002). *Estimación de proteína potencialmente utilizable en fórmulas infantiles de inicio para neonatos prematuros y de término*. Obtenido de Archivos Latinoamericanos de Nutrición: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222002000100006#:~:text=El%20nitr%C3%B3geno%20se%20determin%C3%B3%20por,proteico\)%20x%206%2C25.](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000100006#:~:text=El%20nitr%C3%B3geno%20se%20determin%C3%B3%20por,proteico)%20x%206%2C25.)
- bioMérieux S.A. (2022). *Mohos y levaduras* . Obtenido de BioMérieux: <https://www.biomerieux.es/mohos-y-levaduras#:~:text=Las%20levaduras%20pueden%20crecer%20en,alimento%20y%20producen%20diferentes%20metabolitos.>
- Bioser. (2023). *Extracto de levadura bacteriológico*. Obtenido de Bioser: <https://www.bioser.com/productos/bacteriological-yeast-extract1x25-kg/>
- Broach, J. (01 de septiembre de 2012). Control nutricional del crecimiento y desarrollo de la levadura. *Genetics Society of America*, 73-105. doi:<https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Crueger, W. (1990). *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Sinauer Associates.
- Fellows, P. (2009). *Food Processing Technology: Principles and Practice*. Woodhead Publishing.

- Goodfellow, M., y Stackerbrandt., M. (1991). *Técnicas ácidos nucleicos en bacterias sistemática*. Nueva Jersey: EE. UU. .
- Inés, A., Orruño, M., y Barcina, I. (2019). *Cálculo de dos Parámetros que Definen el Crecimiento Bacteriano*. Obtenido de Universidad del País Vasco: [https://ocw.ehu.es/file.php/48/Tema\\_4.\\_calculo\\_de\\_los\\_parametros\\_que\\_definen\\_el\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](https://ocw.ehu.es/file.php/48/Tema_4._calculo_de_los_parametros_que_definen_el_crecimiento_bacteriano.pdf)
- Jacob, F., Streigel, L., Rychlik, M., y Hutzler, M. (2019). *Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture.*. Obtenido de European Food Research and Technolog: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-019-03237-9>
- Lifeder. (2024). *Crecimiento bacteriano: curva, fases, factores*. Obtenido de Lifeder: <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/>
- Lipke, P., & Ovalle, R. (1998). *Cell Wall architecture in yeast: New structure and new challenges*. doi:180: 37353740
- Löffler, P. (2009). *Cell lysis and protein extraction*. Obtenido de Academic: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-6)
- Madigan, M., y al., e. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
- McAuliffe, J., y al., e. (2017). Yeast Extract Production from Spent Brewer's Yeast. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
- Mejía, J., Montoya, R., Cortés, C., y Saavedra, A. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. 27(4). Obtenido de Información Tecnológica: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v27n4/art02.pdf>
- Merck. (2024). *Extracto de levadura granulada*. Obtenido de Merck: [https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/Yeast-extract-granulated,MDA\\_CHEM-103753#overview](https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/Yeast-extract-granulated,MDA_CHEM-103753#overview)
- Merck. (2024). *Yeast Extract*. Obtenido de Merck: <https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/YEAST-EXTRACT-FOR-USE-IN-MICROBIAL,GT-Y1625-250G>
- Montero, M. (2005). *Métodos de cultivo celular cultivo celular y obtención de proteínas de levaduras*. Obtenido de TDX: [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1805/4.MATERIAL\\_METODOS.pdf;jSESSIONID=BB957D3B8BF559CEFE23D1C049369B88?sequence=5](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1805/4.MATERIAL_METODOS.pdf;jSESSIONID=BB957D3B8BF559CEFE23D1C049369B88?sequence=5)
- Otero, M. (2010). *Obtención de extracto de levadura a partir de residuo de extracción alcalina de ácido ribonucleico de Candida utilis*. Obtenido de Instituto Cubano de

Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar:  
[https://www.researchgate.net/publication/237030028\\_Obtencion\\_de\\_extracto\\_de\\_levadura\\_a\\_partir\\_de\\_residuo\\_de\\_extraccion\\_alcalina\\_de\\_acido\\_ribonucleico\\_de\\_Ca ndida\\_utilis](https://www.researchgate.net/publication/237030028_Obtencion_de_extracto_de_levadura_a_partir_de_residuo_de_extraccion_alcalina_de_acido_ribonucleico_de_Ca ndida_utilis)

Palma, J. d., Brandelli, A., y Záchia, M. (2003). *Production of yeast extract from whey using Kluyveromyces marxianus*. Obtenido de Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000100017>

Pardo, S., y Glavano, M. (2009). *Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica Saccharomyces boulardii: efecto del preacondicionamiento fisiológico*. Obtenido de Revista Iberoamericana de Micología: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-estudios-viabilidad-vitalidad-frente-al-13139640>

Salinas, D. (2022). *Cinética del crecimiento de levaduras Saccharomyces cerevisiae en diferentes sustratos*. Obtenido de Universidad Técnica de Machala: [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18609/1/E-10635\\_SALINAS%20QUITO%20DANIEL%20FERNANDO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18609/1/E-10635_SALINAS%20QUITO%20DANIEL%20FERNANDO.pdf)

Sánchez, Ó., y Cardona, C. (2005). *Producción biotecnológica de alcohol carburante II: integración de procesos*. Obtenido de INCI: [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442005001100006](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100006)

Santamaría, R. (2022). Evaluación de cepas de levadura para producción de alcohol en una destilería. *Atagua*, 17-26.

Stanbury, P., Whitaker, A., y Hall, S. (2016). *Principles of Fermentation Technology*. Elsevier.

Suárez, C., Garrido, N., y Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*., 50(1), 20-28. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

Téllez, P., Peraza, F., Fera, A., y Andrade, I. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(01).

UASLP. (2013). *Conteo celular y evaluación de viabilidad*. Obtenido de Creative Commons: [https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)

Universidad de Buenos Aires. (2010). *Balances Macroscópicos de Materia y Energía*. Obtenido de Carrera de especialización en biotecnología industrial: <https://biotecnologiaindustrial.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2010/04/2013-2Balances-M-y-E.pdf>

- Universidad Nacional del Litoral. (2023). *Las Levaduras*. Obtenido de UNL: <https://www.fiq.unl.edu.ar/culturacientifica/extension-fiq/mundo-microscopico-i-la-levadura/>
- UNL. (2020). *Métodos de control de calidad de levadura y cerveza*. Obtenido de UNL: [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/162519/CONICET\\_Digital\\_Nro.8eb102e9-3eda-457d-8c7f-9054b7e4f0d6\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/162519/CONICET_Digital_Nro.8eb102e9-3eda-457d-8c7f-9054b7e4f0d6_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Uribe, L. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora*. Obtenido de Pontífica Universidad Javeriana: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8298/tesis276.pdf;jsessionid=60D99C5355E4B2478639C4979427E110?sequence=1>
- Vásquez, H., y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería de investigación y tecnología*, 8(4).
- Zarei, O., Datmalchi, S., y Hamzeh, M. (2016). *Un protocolo simple y rápido para producir extracto de levadura de Saccharomyces cerevisiae adecuado para preparar medios de cultivo bacterianos*. Obtenido de NIH: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316271>

## XII. ANEXOS

### G. Datos originales

#### Crecimiento de levaduras

**Cuadro 5.** *Datos de conteo celular en cámara de Neubauer y consumo de sustrato durante la curva de crecimiento realizada*

Muestra	Tiempo (h)	Conteo celular en cámara de Neubauer	Concentración de sustrato (% m/v)
0	$0.0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$58 \pm 1$	$9.43 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
1	$0.5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$67 \pm 1$	$8.67 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
2	$1.0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$74 \pm 1$	$8.23 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
3	$1.5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$82 \pm 1$	$7.71 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
4	$2.0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$90 \pm 1$	$7.18 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
5	$2.5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$99 \pm 1$	$6.69 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
6	$3.0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$109 \pm 1$	$6.21 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
7	$3.5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$120 \pm 1$	$5.72 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
8	$4.0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$134 \pm 1$	$5.26 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
9	$4.5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$176 \pm 1$	$4.87 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$
10	$5.5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$218 \pm 1$	$4.51 \pm 2.5 \cdot 10^{-8}$

Fuente: elaboración propia.

Nota: los datos de concentración de sustrato se obtuvieron de análisis de HPLC.

#### Hidrólisis ácida

**Cuadro 6.** *Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis ácida a 0.5 M*

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$87 \pm 1$	$12 \pm 1$
2	$4.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$62 \pm 1$	$20 \pm 1$
3	$6.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$49 \pm 1$	$28 \pm 1$
6	$8.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$63 \pm 1$	$55 \pm 1$
7	$10.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$60 \pm 1$	$78 \pm 1$
8	$12.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$42 \pm 1$	$89 \pm 1$
9	$14.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$28 \pm 1$	$125 \pm 1$
10	$16.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$2 \pm 1$	$148 \pm 1$
11	$18.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$157 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 7.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis acida a 0.5 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$98 \pm 1$	$9 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$89 \pm 1$	$17 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$76 \pm 1$	$29 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$68 \pm 1$	$57 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$76 \pm 1$	$98 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$34 \pm 1$	$89 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$19 \pm 1$	$142 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$3 \pm 1$	$157 \pm 1$
11	$18 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$136 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 8.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis acida a 0.5 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$86 \pm 1$	$17 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$79 \pm 1$	$26 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$94 \pm 1$	$48 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$48 \pm 1$	$43 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$61 \pm 1$	$86 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$57 \pm 1$	$147 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$14 \pm 1$	$125 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$2 \pm 1$	$167 \pm 1$
11	$18 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$141 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 9.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis ácida a 1 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$97 \pm 1$	$129 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$67 \pm 1$	$114 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$52 \pm 1$	$104 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$51 \pm 1$	$133 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$32 \pm 1$	$123 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$15 \pm 1$	$124 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$3 \pm 1$	$116 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$129 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 10.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis ácida a 1 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$94 \pm 1$	$114 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$78 \pm 1$	$119 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$72 \pm 1$	$159 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$64 \pm 1$	$178 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$28 \pm 1$	$137 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$19 \pm 1$	$172 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$1 \pm 1$	$108 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$142 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 11.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis ácida a 1M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$102 \pm 1$	$124 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$80 \pm 1$	$136 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$49 \pm 1$	$109 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$58 \pm 1$	$197 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$36 \pm 1$	$193 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$7 \pm 1$	$116 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$2 \pm 1$	$153 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$174 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 12.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis acida a 1.5 M

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
1	$30 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$13 \pm 1$	$212 \pm 1$
2	$60 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$5 \pm 1$	$106 \pm 1$
3	$80 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$5 \pm 1$	$151 \pm 1$
4	$100 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$3 \pm 1$	$138 \pm 1$
5	$120 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$1 \pm 1$	$157 \pm 1$
6	$140 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$189 \pm 1$
7	$160 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$149 \pm 1$
8	$180 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$157 \pm 1$
9	$200 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$146 \pm 1$
10	$220 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$167 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 13.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis acida a 1.5 M

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
1	$30 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$17 \pm 1$	$254 \pm 1$
2	$60 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$8 \pm 1$	$145 \pm 1$
3	$80 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$4 \pm 1$	$124 \pm 1$
4	$100 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$2 \pm 1$	$185 \pm 1$
5	$120 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$154 \pm 1$
6	$140 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$147 \pm 1$
7	$160 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$159 \pm 1$
8	$180 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$162 \pm 1$
9	$200 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$183 \pm 1$
10	$220 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$158 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 14.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis ácida a 1.5 M

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
1	$30 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$11 \pm 1$	$186 \pm 1$
2	$60 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$7 \pm 1$	$194 \pm 1$
3	$80 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$5 \pm 1$	$167 \pm 1$
4	$100 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$2 \pm 1$	$146 \pm 1$
5	$120 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$163 \pm 1$
6	$140 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$175 \pm 1$
7	$160 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$137 \pm 1$
8	$180 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$153 \pm 1$
9	$200 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$148 \pm 1$
10	$220 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$174 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

#### Hidrólisis básica

**Cuadro 15.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis básica a 0.5 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$74 \pm 1$	$25 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$67 \pm 1$	$38 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$88 \pm 1$	$91 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$101 \pm 1$	$212 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$59 \pm 1$	$139 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$87 \pm 1$	$232 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$48 \pm 1$	$214 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$2 \pm 1$	$138 \pm 1$
11	$18 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$174 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 16.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 0.5 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$82 \pm 1$	$29 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$75 \pm 1$	$47 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$94 \pm 1$	$102 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$124 \pm 1$	$227 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$68 \pm 1$	$169 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$81 \pm 1$	$274 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$29 \pm 1$	$231 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$3 \pm 1$	$134 \pm 1$
11	$18 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$157 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 17.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis básica a 0.5 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$86 \pm 1$	$24 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$61 \pm 1$	$42 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$94 \pm 1$	$112 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$69 \pm 1$	$122 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$72 \pm 1$	$195 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$35 \pm 1$	$174 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$28 \pm 1$	$242 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$3 \pm 1$	$130 \pm 1$
11	$18 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$168 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 18.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis básica a 1 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$36 \pm 1$	$14 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$68 \pm 1$	$41 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$61 \pm 1$	$50 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$57 \pm 1$	$76 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$43 \pm 1$	$139 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$37 \pm 1$	$197 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$8 \pm 1$	$245 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$208 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 19.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 1 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$54 \pm 1$	$20 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$72 \pm 1$	$43 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$78 \pm 1$	$86 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$43 \pm 1$	$74 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$67 \pm 1$	$167 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$52 \pm 1$	$211 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$9 \pm 1$	$184 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$176 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 20.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de hidrólisis básica a 1 M

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$49 \pm 1$	$17 \pm 1$
2	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$76 \pm 1$	$42 \pm 1$
3	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$84 \pm 1$	$82 \pm 1$
6	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$39 \pm 1$	$54 \pm 1$
7	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$57 \pm 1$	$121 \pm 1$
8	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$62 \pm 1$	$201 \pm 1$
9	$14 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$7 \pm 1$	$217 \pm 1$
10	$16 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$145 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 21.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de hidrólisis básica a 1.5 M

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
1	$30 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$116 \pm 1$	$68 \pm 1$
2	$60 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$71 \pm 1$	$73 \pm 1$
3	$80 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$29 \pm 1$	$118 \pm 1$
4	$100 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$3 \pm 1$	$125 \pm 1$
5	$120 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$1 \pm 1$	$130 \pm 1$
6	$140 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$155.6 \pm 1$
7	$160 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$173.2 \pm 1$
8	$180 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$190.8 \pm 1$
9	$200 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$208.4 \pm 1$
10	$220 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$226 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 22.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 1.5 M

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
1	$30 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$135 \pm 1$	$74 \pm 1$
2	$60 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$46 \pm 1$	$61 \pm 1$
3	$80 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$16 \pm 1$	$97 \pm 1$
4	$100 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$2 \pm 1$	$147 \pm 1$
5	$120 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$168 \pm 1$
6	$140 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$152 \pm 1$
7	$160 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$194 \pm 1$
8	$180 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$130 \pm 1$
9	$200 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$179 \pm 1$
10	$220 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$156 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 23.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de hidrólisis básica a 1.5 M

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
1	$30 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$84 \pm 1$	$42 \pm 1$
2	$60 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$69 \pm 1$	$84 \pm 1$
3	$80 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$32 \pm 1$	$138 \pm 1$
4	$100 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$2 \pm 1$	$136 \pm 1$
5	$120 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$1 \pm 1$	$157 \pm 1$

Muestra	Tiempo (s)	Células viables	Células no viables
6	$140 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$139 \pm 1$
7	$160 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$206 \pm 1$
8	$180 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$148 \pm 1$
9	$200 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$197 \pm 1$
10	$220 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0 \pm 1$	$135 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

### Cambios de temperatura

**Cuadro 24.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de lisis por cambios temperatura

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$21 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$116 \pm 1$	$12 \pm 1$
2	$30 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$1.80 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$117 \pm 1$	$24 \pm 1$
3	$32.4 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$124 \pm 1$	$30 \pm 1$
4	$40 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.63 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$103 \pm 1$	$43 \pm 1$
5	$50 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$3.55 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$60 \pm 1$	$50 \pm 1$
6	$60 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$4.33 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$52 \pm 1$	$63 \pm 1$
7	$70 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$5.20 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$47 \pm 1$	$91 \pm 1$
8	$80 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$6.42 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$28 \pm 1$	$67 \pm 1$
9	$85 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$7.48 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$49 \pm 1$	$164 \pm 1$
10	$90 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$9.32 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$18 \pm 1$	$84 \pm 1$
11	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$10.98 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$12 \pm 1$	$111 \pm 1$
12	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$13.15 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$4 \pm 1$	$86 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 25.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de lisis por cambios temperatura

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$21 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$36 \pm 1$	$3 \pm 1$
2	$30 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$1.87 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$67 \pm 1$	$17 \pm 1$
3	$31.33 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$98 \pm 1$	$27 \pm 1$
4	$40 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.87 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$45 \pm 1$	$21 \pm 1$
5	$50 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$4.13 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$63 \pm 1$	$52 \pm 1$
6	$60 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$5.27 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$119 \pm 1$	$130 \pm 1$
7	$70 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$6.82 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$37 \pm 1$	$58 \pm 1$
8	$80 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$8.88 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$78 \pm 1$	$154 \pm 1$
9	$85 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$12.33 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$35 \pm 1$	$123 \pm 1$

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
10	$90 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$15.55 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$24 \pm 1$	$105 \pm 1$
11	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$20.50 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$12 \pm 1$	$94 \pm 1$
12	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$23.57 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$5 \pm 1$	$112 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 26.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de lisis por cambios temperatura

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$21 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$68 \pm 1$	$5 \pm 1$
2	$30 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$1.78 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$85 \pm 1$	$21 \pm 1$
3	$34.19 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$109 \pm 1$	$33 \pm 1$
4	$40 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.30 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$38 \pm 1$	$15 \pm 1$
5	$50 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$5.03 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$91 \pm 1$	$63 \pm 1$
6	$60 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$6.42 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$121 \pm 1$	$135 \pm 1$
7	$70 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$8.30 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$64 \pm 1$	$97 \pm 1$
8	$80 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$10.87 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$92 \pm 1$	$203 \pm 1$
9	$85 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$13.75 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$35 \pm 1$	$123 \pm 1$
10	$90 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$15.40 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$29 \pm 1$	$137 \pm 1$
11	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$18.63 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$16 \pm 1$	$138 \pm 1$
12	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$21.50 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$4 \pm 1$	$93 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 27.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de lisis por temperatura de ebullición del agua

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$21.00 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$134 \pm 1$	$7 \pm 1$
2	$27.64 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$119 \pm 1$	$17 \pm 1$
3	$94.00 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$22.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$7 \pm 1$	$73 \pm 1$
4	$94.00 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$27.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$2 \pm 1$	$86 \pm 1$
5	$94.00 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$32.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$83 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 28.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de lisis por temperatura de ebullición del agua

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$21 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$142 \pm 1$	$10 \pm 1$
2	$27.97 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$122 \pm 1$	$20 \pm 1$
3	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$20.95 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$8 \pm 1$	$95 \pm 1$
4	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$25.95 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$1 \pm 1$	$97 \pm 1$
5	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$30.95 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$124 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 29.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de lisis por temperatura de ebullición del agua

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$21 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$185 \pm 1$	$2 \pm 1$
2	$27.82 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$162 \pm 1$	$17 \pm 1$
3	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$21.42 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$11 \pm 1$	$134 \pm 1$
4	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$26.42 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$3 \pm 1$	$149 \pm 1$
5	$94 \pm 5 \cdot 10^{-2}$	$31.42 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$0 \pm 1$	$95 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

#### Lisis mecánica

**Cuadro 30.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la primera repetición de lisis por lisis mecánica a 11000 rpm

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$152 \pm 1$	$1 \pm 1$
2	$1 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$126 \pm 1$	$1 \pm 1$
3	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$182 \pm 1$	$3 \pm 1$
4	$3 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$189 \pm 1$	$7 \pm 1$
5	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$138 \pm 1$	$10 \pm 1$
6	$5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$119 \pm 1$	$19 \pm 1$
7	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$97 \pm 1$	$31 \pm 1$
8	$7 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$120 \pm 1$	$55 \pm 1$
9	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$120 \pm 1$	$74 \pm 1$
10	$9 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$94 \pm 1$	$68 \pm 1$
11	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$87 \pm 1$	$70 \pm 1$
12	$11 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$71 \pm 1$	$58 \pm 1$
13	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$69 \pm 1$	$66 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 31.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la segunda repetición de lisis por lisis mecánica a 11000 rpm

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$123 \pm 1$	$2 \pm 1$
2	$1 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$144 \pm 1$	$4 \pm 1$
3	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$156 \pm 1$	$7 \pm 1$
4	$3 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$185 \pm 1$	$12 \pm 1$
5	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$135 \pm 1$	$10 \pm 1$
6	$5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$114 \pm 1$	$14 \pm 1$
7	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$142 \pm 1$	$22 \pm 1$
8	$7 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$145 \pm 1$	$24 \pm 1$
9	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$109 \pm 1$	$26 \pm 1$
10	$9 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$106 \pm 1$	$31 \pm 1$
11	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$118 \pm 1$	$47 \pm 1$
12	$11 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$69 \pm 1$	$33 \pm 1$
13	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$75 \pm 1$	$46 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 32.** Resultado de conteo celular de la cámara Neubauer en dilución de 1:100 para la tercera repetición de lisis por lisis mecánica a 11000 rpm

Muestra	Tiempo (min)	Células viables	Células no viables
1	$0 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$203 \pm 1$	$2 \pm 1$
2	$1 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$187 \pm 1$	$7 \pm 1$
3	$2 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$160 \pm 1$	$8 \pm 1$
4	$3 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$136 \pm 1$	$13 \pm 1$
5	$4 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$123 \pm 1$	$14 \pm 1$
6	$5 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$125 \pm 1$	$21 \pm 1$
7	$6 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$105 \pm 1$	$23 \pm 1$
8	$7 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$133 \pm 1$	$36 \pm 1$
9	$8 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$114 \pm 1$	$44 \pm 1$
10	$9 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$106 \pm 1$	$43 \pm 1$
11	$10 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$107 \pm 1$	$48 \pm 1$
12	$11 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$91 \pm 1$	$46 \pm 1$
13	$12 \pm 8.33 \cdot 10^{-5}$	$110 \pm 1$	$68 \pm 1$

Fuente: elaboración propia.

## Datos de placa

**Cuadro 33.** *Datos de placa de equipos utilizados.*

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>	<b>Serie</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Otro</b>
Incubadora con agitación	Jeio Tech	SI-600	P118043	120V	0-400rpm
Centrífuga	Sorvall	RT7	N/A	115V	0-7000rpm
Incubadora	Lab-Line Imperial III	310	0599-0437	120V	0-90°C
Incubadora de convección	VWR	Symphony	0411078114 J003	120V	N/A
Autoclave	Tuttnauer	1840ELVP- WR-D	19110541	230V	N/A
Microscopio	Leica	DM500	N/A	5V	N/A
Balanza analítica	Ohaus	PX163	C122853906	120V	0-160g
Campana de flujo laminar	Ser Proma	CFLH600	23-23	115V	N/A
Medidor de pH	Extech Instruments	PCSTestr 35	PCTEST35	N/A	0.00-14.00 pH

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>	<b>Serie</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Otro</b>
Indicador de temperatura	ExTech Instruments	TM20	N/A	N/A	-40-70°C
Motor de agitación	Stir-Pak	50000-00	RS232	115V	60-6000rpm
Resistencia para control de temperatura	Boyu	BT-01	N/A	N/A	23-30°C
Agitador	Servodyne	50000-40	K97007221	120V	150-60000rpm
Cámara de Neubauer	Estresen	B00SJLBFD S	N/A	N/A	0.1mm de profundidad
Hach	Hach	DR900	N/A	N/A	N/A
Plancha de calentamiento con agitación	Thermo Scientific	Thermolyne	SP88850100	120V	2-540°C

Fuente: elaboración propia.

## Cálculos de muestra

### Cálculo 1. Concentración celular

$$\begin{aligned} \text{Concentración celular} &= \frac{\text{No. de células} * 10^6}{\text{área de cámara}} = \frac{58 \text{ células} * 10^6}{0.4 \text{ mm}^3} \\ &= 1.45 * 10^{10} \frac{\text{células}}{\text{mm}^3} \end{aligned}$$

Fuente: (UASLP, 2013)

Nota: Se presenta el cálculo realizado para la obtención de la concentración celular, partiendo de la cuenta de células realizada con la cámara de Neubauer. En el cálculo de ejemplo se utilizan los datos de la primera muestra tomada realizada para la curva de crecimiento. Este se repite con todas las muestras en donde se requiere.

### Cálculo 2. Velocidad específica de crecimiento

$$\text{Velocidad de rxn} = \frac{\Delta \ln(Cn)}{\Delta t} = \frac{\ln(1.68 * 10^{10}) - \ln(1.45 * 10^{10})}{0.5 - 0} = 0.288$$

Fuente: (Inés, et al., 2019)

Nota: Se obtiene la velocidad de reacción obtenida como parte del análisis de la curva de crecimiento. Este cálculo se repite con todos los datos de la curva calibración. Para este se toman en cuenta los datos presentados en el cuadro 1.

### Cálculo 3. Total de células

$$\text{Total de células} = \text{células viables} + \text{células no viables} = 87 + 12 = 87.88 \text{ células}$$

Nota: se presenta el cálculo de total de células en la cuenta realizada en la cámara de Neubauer. Se repite el cálculo con todas las muestras tomadas, tanto para la curva de calibración, como para el análisis de cada método de lisis estudiado.

**Cálculo 4. Viabilidad celular**

$$Viabilidad\ celular = \frac{células\ viables}{total\ de\ células} * 100\% = \frac{87}{99} * 100\% = 87.88\%$$

Nota: el cálculo anterior realiza para determinar la viabilidad celular en cada muestra realizada en cada parte del estudio. Se toman los valores de cada muestra tomada en todas las etapas del estudio.

**Cálculo 5. Proteína en extracto de levadura**

$$Proteína = 6.21 \frac{mg}{L} * 100 * 6.25 * 0.05L$$

Fuente: (Binaghi, et al., 2002)

Nota: se realiza el cálculo correspondiente para la determinación de la proteína en el extracto de levadura, utilizando la relación de nitrógeno total en las proteínas. Para esto, se utiliza el factor de Kjeldahl de 6.25 para relacionarlos.

## H. Datos calculados

### Hidrólisis ácida

**Cuadro 34.** Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis ácida a 0.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	99 ± 1.41	87.88 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
2	82 ± 1.41	75.61 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
3	77 ± 1.41	63.64 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
6	118 ± 1.41	53.39 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
7	138 ± 1.41	43.48% ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
8	131 ± 1.41	32.06 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
9	153 ± 1.41	18.30 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
10	150 ± 1.41	1.33 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
11	157 ± 1.41	0.00 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 35.** Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis ácida a 0.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	107 ± 1.41	91.59 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
2	106 ± 1.41	83.96 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
3	105 ± 1.41	72.38 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
6	125 ± 1.41	54.40 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
7	174 ± 1.41	43.68 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
8	123 ± 1.41	27.64 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
9	161 ± 1.41	11.80 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
10	160 ± 1.41	1.88 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>
11	136 ± 1.41	0.00 ± 7.48*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 36.** Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis ácida a 0.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	103 ± 1.41	83.50 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
2	105 ± 1.41	75.24 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
3	142 ± 1.41	66.20 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
6	91 ± 1.41	52.75 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
7	147 ± 1.41	41.50 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
8	204 ± 1.41	27.94 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
9	139 ± 1.41	10.07 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
10	169 ± 1.41	1.18 ± 7.28*10 <sup>-1</sup>
11	141 ± 1.41	0.00% ± 7.28*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 37.** Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis ácida a 1 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	226 ± 1.41	42.92 ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
2	181 ± 1.41	37.02 ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
3	156 ± 1.41	33.33 ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
6	184 ± 1.41	27.72 ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
7	155 ± 1.41	20.65 ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
8	139 ± 1.41	10.79% ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
9	119 ± 1.41	2.52% ± 8.97*10 <sup>-1</sup>
10	129 ± 1.41	0.00 ± 8.97*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 38.** Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis ácida a 1 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	208 ± 1.41	45.19 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
2	197 ± 1.41	39.59 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
3	231 ± 1.41	31.17 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
6	242 ± 1.41	26.45 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
7	165 ± 1.41	16.97 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
8	191 ± 1.41	9.95 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
9	109 ± 1.41	0.92 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>
10	142 ± 1.41	0.00 ± 9.58*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 39.** Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis ácida a 1 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	226 ± 1.41	45.13 ± 1
2	216 ± 1.41	37.04 ± 1
3	158 ± 1.41	31.01 ± 1
6	255 ± 1.41	22.75 ± 1
7	229 ± 1.41	15.72 ± 1
8	123 ± 1.41	5.69 ± 1
9	155 ± 1.41	1.29 ± 1
10	174 ± 1.41	0.00% ± 1

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 40.** Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis ácida a 1.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	225 ± 1.41	5.78 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
2	111 ± 1.41	4.50 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
3	156 ± 1.41	3.21 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
4	141 ± 1.41	2.13% ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
5	158 ± 1.41	0.63 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
6	189 ± 1.41	0.00 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
7	149 ± 1.41	0.00% ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
8	157 ± 1.41	0.00 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
9	146 ± 1.41	0.00% ± 1.34*10 <sup>-1</sup>
10	167 ± 1.41	0.00 ± 1.34*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 41.** Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis ácida a 1.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	271 ± 1.41	6.27 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
2	153 ± 1.41	5.23 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
3	128 ± 1.41	3.13 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
4	187 ± 1.41	1.07 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
5	154 ± 1.41	0.00 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
6	147 ± 1.41	0.00 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
7	159 ± 1.41	0.00 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
8	162 ± 1.41	0.00 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
9	183 ± 1.41	0.00 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>
10	158 ± 1.41	0.00 ± 1.55*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 42.** Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis ácida a 1.5 M.

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	197 ± 1.41	5.58 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
2	201 ± 1.41	3.48 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
3	172 ± 1.41	2.91 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
4	148 ± 1.41	1.35 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
5	163 ± 1.41	0.00 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
6	175 ± 1.41	0.00 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
7	137 ± 1.41	0.00 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
8	153 ± 1.41	0.00 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
9	148 ± 1.41	0.00 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>
10	174 ± 1.41	0.00 ± 1.50*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

#### Hidrólisis básica

**Cuadro 43.** Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición de la hidrólisis básica a 0.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	99 ± 1.41	74.75 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
2	105 ± 1.41	63.81 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
3	179 ± 1.41	49.16 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
6	313 ± 1.41	32.27 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
7	198 ± 1.41	29.80 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
8	319 ± 1.41	27.27 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
9	262 ± 1.41	18.32 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
10	140 ± 1.41	1.43 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>
11	174 ± 1.41	0.00 ± 6.79*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 44.** Cálculos de viabilidad en la segunda repetición de hidrólisis básica a 0.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	111 ± 1.41	73.87 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
2	122 ± 1.41	61.48 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
3	196 ± 1.41	47.96 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
6	351 ± 1.41	35.33 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
7	237 ± 1.41	28.69 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
8	355 ± 1.41	22.82 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
9	260 ± 1.41	11.15 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
10	137 ± 1.41	2.19 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>
11	157 ± 1.41	0.00 ± 7.08*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 45.** Cálculos de viabilidad en la tercera repetición de hidrólisis básica a 0.5 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	110 ± 1.41	78.18 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
2	103 ± 1.41	59.22 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
3	206 ± 1.41	45.63 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
6	191 ± 1.41	36.13 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
7	267 ± 1.41	26.97 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
8	209 ± 1.41	16.75 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
9	270 ± 1.41	10.37 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
10	133 ± 1.41	2.26 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>
11	168 ± 1.41	0.00 ± 7.49*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 46.** Cálculos de viabilidad en la primera repetición de hidrólisis básica a 1 M

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	50 ± 1.41	72.00 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
2	109 ± 1.41	62.39 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
3	111 ± 1.41	54.95 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
6	133 ± 1.41	42.86 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
7	182 ± 1.41	23.63 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
8	234 ± 1.41	15.81 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
9	253 ± 1.41	3.16 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>
10	208 ± 1.41	0.00 ± 6.87*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 47.** Cálculos de viabilidad en segunda repetición de la hidrólisis básica a 1 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	74 ± 1.41	72.97 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
2	115 ± 1.41	62.61 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
3	164 ± 1.41	47.56 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
6	117 ± 1.41	36.75 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
7	234 ± 1.41	28.63 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
8	263 ± 1.41	19.77 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
9	193 ± 1.41	4.66 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>
10	176 ± 1.41	0.00 ± 6.56*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 48.** Cálculos de viabilidad en tercera repetición de la hidrólisis básica a 1 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	66 ± 1.41	74.24 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
2	118 ± 1.41	64.41 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
3	166 ± 1.41	50.60 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
6	93 ± 1.41	41.94 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
7	178 ± 1.41	32.02 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
8	263 ± 1.41	23.57 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
9	224 ± 1.41	3.13 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>
10	145 ± 1.41	0.00 ± 6.41*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 49.** Cálculos de viabilidad en la primera repetición de hidrólisis básica a 1.5 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	184 ± 1.41	63.04 ± 1.75
2	144 ± 1.41	49.31 ± 1.75
3	147 ± 1.41	19.73 ± 1.75
4	128 ± 1.41	2.34 ± 1.75
5	131 ± 1.41	0.76 ± 1.75
6	155 ± 1.41	0.00 ± 1.75
7	173 ± 1.41	0.00 ± 1.75
8	190 ± 1.41	0.00 ± 1.75
9	208 ± 1.41	0.00 ± 1.75
10	226 ± 1.41	0.00 ± 1.75

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 50.** Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición de la hidrólisis básica a 1.5 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	209 ± 1.41	64.59 ± 1.86
2	107 ± 1.41	42.99 ± 1.86
3	113 ± 1.41	14.16 ± 1.86
4	149 ± 1.41	1.34 ± 1.86
5	168 ± 1.41	0.00 ± 1.86
6	152 ± 1.41	0.00 ± 1.86
7	194 ± 1.41	0.00 ± 1.86
8	130 ± 1.41	0.00 ± 1.86
9	179 ± 1.41	0.00 ± 1.86
10	156 ± 1.41	0.00 ± 1.86

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 51.** Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición de la hidrólisis básica a 1.5 M

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	126 ± 1.41	66.67 ± 1.80
2	153 ± 1.41	45.10 ± 1.80
3	170 ± 1.41	18.82 ± 1.80
4	138 ± 1.41	1.45 ± 1.80
5	158 ± 1.41	0.63 ± 1.80
6	139 ± 1.41	0.00 ± 1.80
7	206 ± 1.41	0.00 ± 1.80
8	148 ± 1.41	0.00 ± 1.80
9	197 ± 1.41	0.00 ± 1.80
10	135 ± 1.41	0.00 ± 1.80

Fuente: elaboración propia.

Lisis por cambios de temperatura

**Cuadro 52.** Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición lisis por cambios de temperatura

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	128 ± 1.41	90.63 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
2	141 ± 1.41	82.98 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
3	154 ± 1.41	80.00 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
4	146 ± 1.41	70.55 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
5	110 ± 1.41	54.55 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
6	115 ± 1.41	45.22 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
7	138 ± 1.41	34.06 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
8	95 ± 1.41	29.47 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
9	213 ± 1.41	23.00 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
10	102 ± 1.41	17.65 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
11	123 ± 1.41	9.76 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>
12	90 ± 1.41	4.44 ± 7.00*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 53.** Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición lisis por cambios de temperatura

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	39 ± 1.41	92.31 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
2	84 ± 1.41	79.76 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
3	125 ± 1.41	78.22 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
4	66 ± 1.41	68.18 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
5	115 ± 1.41	54.78 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
6	249 ± 1.41	47.79 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
7	95 ± 1.41	38.95 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
8	232 ± 1.41	33.62 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
9	158 ± 1.41	22.15 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
10	129 ± 1.41	18.60 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
11	106 ± 1.41	11.32 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>
12	117 ± 1.41	4.27 ± 6.68*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 54.** *Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición lisis por cambios de temperatura*

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	73 ± 1.41	93.15 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
2	106 ± 1.41	80.19 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
3	142 ± 1.41	76.63 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
4	53 ± 1.41	71.70 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
5	154 ± 1.41	59.09 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
6	256 ± 1.41	47.27 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
7	161 ± 1.41	39.75 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
8	295 ± 1.41	31.19 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
9	158 ± 1.41	22.15 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
10	166 ± 1.41	17.47 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
11	154 ± 1.41	10.39 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>
12	97 ± 1.41	4.12 ± 6.85*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 55.** *Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua*

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	141 ± 1.41	95.04 ± 1.73*10 <sup>-1</sup>
2	136 ± 1.41	87.19 ± 1.73*10 <sup>-1</sup>
3	80 ± 1.41	8.75 ± 1.73*10 <sup>-1</sup>
4	88 ± 1.41	2.27 ± 1.73*10 <sup>-1</sup>
5	83 ± 1.41	0.00 ± 1.73*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 56.** *Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua*

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	152 ± 1.41	93.42 ± 1.78*10 <sup>-1</sup>
2	142 ± 1.41	85.24 ± 1.78*10 <sup>-1</sup>
3	103 ± 1.41	7.77 ± 1.78*10 <sup>-1</sup>
4	98 ± 1.41	1.02 ± 1.78*10 <sup>-1</sup>
5	124 ± 1.41	0.00 ± 1.78*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 57.** Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	187 ± 1.41	98.93 ± 1.77*10 <sup>-1</sup>
2	179 ± 1.41	90.40 ± 1.77*10 <sup>-1</sup>
3	145 ± 1.41	7.59 ± 1.77*10 <sup>-1</sup>
4	152 ± 1.41	1.97 ± 1.77*10 <sup>-1</sup>
5	95 ± 1.41	0.00 ± 1.77*10 <sup>-1</sup>

Fuente: elaboración propia.

Lisis mecánica

**Cuadro 58.** Resultados de cálculos de viabilidad en la primera repetición lisis mecánica a 11000 rpm

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	153 ± 1.41	98.80 ±2.5
2	127 ± 1.41	98.87 ±2.5
3	185 ± 1.41	98.12 ±2.5
4	196 ± 1.41	96.30 ±2.5
5	148 ± 1.41	92.69 ±2.5
6	138 ± 1.41	85.57 ±2.5
7	128 ± 1.41	75.64 ±2.5
8	175 ± 1.41	68.49 ±2.5
9	194 ± 1.41	61.73 ±2.5
10	162 ± 1.41	57.46 ±2.5
11	157 ± 1.41	54.96 ±2.5
12	129 ± 1.41	54.85 ±2.5
13	135 ± 1.41	50.48 ±2.5

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 59.** Resultados de cálculos de viabilidad en la segunda repetición lisis mecánica a 11000 rpm

Muestra	Total de células	Viabilidad (%)
1	125 ± 1.41	97.98 ±1.4
2	148 ± 1.41	97.28 ±1.4
3	163 ± 1.41	95.42 ±1.4
4	197 ± 1.41	93.43 ±1.4

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
5	145 ± 1.41	92.85 ±1.4
6	128 ± 1.41	88.37 ±1.4
7	164 ± 1.41	86.47 ±1.4
8	169 ± 1.41	85.53 ±1.4
9	135 ± 1.41	80.41 ±1.4
10	137 ± 1.41	76.84 ±1.4
11	165 ± 1.41	71.29 ±1.4
12	102 ± 1.41	67.25 ±1.4
13	121 ± 1.41	61.27 ±1.4

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 60.** *Resultados de cálculos de viabilidad en la tercera repetición lisis mecánica a 11000 rpm*

<b>Muestra</b>	<b>Total de células</b>	<b>Viabilidad (%)</b>
1	205 ± 1.41	98.84 ±1.54
2	194 ± 1.41	96.25 ±1.54
3	168 ± 1.41	94.78 ±1.54
4	149 ± 1.41	91.25 ±1.54
5	137 ± 1.41	89.54 ±1.54
6	146 ± 1.41	85.25 ±1.54
7	128 ± 1.41	81.47 ±1.54
8	169 ± 1.41	78.56 ±1.54
9	158 ± 1.41	72.14 ±1.54
10	149 ± 1.41	70.99 ±1.54
11	155 ± 1.41	68.59 ±1.54
12	137 ± 1.41	65.94 ±1.54
13	178 ± 1.41	61.38 ±1.54

Fuente: elaboración propia.

## I. Análisis estadístico

**Cuadro 61.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis ácida a 0.5 M

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
87.65	4.05	84.85	90.46
78.27	4.93	74.85	81.69
67.40	4.50	64.29	70.52
53.51	0.83	52.94	54.09
42.88	1.21	42.05	43.72
29.21	2.47	27.50	30.93
13.39	4.34	10.38	16.40
1.46	0.36	1.21	1.72
0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 62.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis ácida a 1 M

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
44.42%	1.29%	43.52%	45.31%
37.88%	1.48%	36.86%	38.91%
31.84%	1.30%	30.94%	32.74%
25.64%	2.58%	23.85%	27.43%
17.78%	2.56%	16.00%	19.55%
8.81%	2.73%	6.92%	10.70%
1.58%	0.84%	0.99%	2.16%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 63.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis ácida a 1 M

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
5.88%	0.36%	5.63%	6.12%
4.41%	0.88%	3.80%	5.01%
3.08%	0.15%	2.97%	3.19%
1.52%	0.55%	1.14%	1.90%

<b>Media (%)</b>	<b>Desviación estándar (%)</b>	<b>Intervalo de confianza al 95% (%)</b>	
0.21%	0.37%	-0.04%	0.46%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 64.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis básica 0.5 M

<b>Media (%)</b>	<b>Desviación estándar (%)</b>	<b>Intervalo de confianza al 95% (%)</b>	
75.60%	2.28%	74.02%	77.18%
61.50%	2.29%	59.91%	63.09%
47.58%	1.80%	46.34%	48.83%
34.57%	2.04%	33.16%	35.98%
28.49%	1.43%	27.50%	29.47%
22.28%	5.28%	18.62%	25.94%
13.28%	4.38%	10.25%	16.32%
1.96%	0.46%	1.64%	2.28%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 65.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis básica 1 M

<b>Media (%)</b>	<b>Desviación estándar (%)</b>	<b>Intervalo de confianza al 95% (%)</b>	
73.07%	1.12%	72.29%	73.85%
63.13%	1.11%	62.37%	63.90%
51.04%	3.72%	48.46%	53.61%
40.51%	3.29%	38.23%	42.80%
28.09%	4.22%	25.17%	31.02%
19.72%	3.88%	17.03%	22.41%
3.65%	0.88%	3.04%	4.26%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 66.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas de la hidrólisis básica 1.5 M

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
64.77%	1.82%	63.51%	66.03%
45.80%	3.22%	43.57%	48.03%
17.57%	2.99%	15.50%	19.64%
1.71%	0.55%	1.33%	2.09%
0.47%	0.41%	0.18%	0.75%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 67.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas la lisis por cambios de temperatura

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
92.03%	1.29%	91.14%	92.92%
80.98%	1.75%	79.77%	82.19%
80.98%	1.29%	91.14%	92.92%
70.14%	1.79%	68.90%	71.38%
56.14%	2.56%	54.37%	57.91%
46.76%	1.36%	45.82%	47.70%
37.59%	3.08%	35.45%	39.72%
31.43%	2.08%	29.98%	32.87%
22.44%	0.49%	22.09%	22.78%
17.91%	0.61%	17.48%	18.33%
10.49%	0.79%	9.94%	11.03%
4.28%	0.16%	4.17%	4.39%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 68.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas la lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
95.80%	2.83%	93.83%	97.76%
80.98%	1.29%	91.14%	92.92%
8.03%	0.63%	7.60%	8.47%
1.76%	0.65%	1.30%	2.21%
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 69.** Resultados estadísticos de las tres pruebas realizadas la lisis mecánica

Media (%)	Desviación estándar (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)	
98.54%	0.49%	98.20%	98.88%
97.47%	1.32%	96.55%	98.38%
96.11%	1.77%	94.88%	97.34%
93.66%	2.53%	91.90%	95.42%
91.69%	1.87%	90.40%	92.99%
86.40%	1.72%	85.21%	87.59%
81.19%	5.42%	77.44%	84.95%
77.53%	8.57%	71.59%	83.46%
71.43%	9.36%	64.94%	77.91%
68.43%	9.94%	61.54%	75.32%
64.95%	8.75%	58.88%	71.01%
62.68%	6.81%	57.96%	67.40%
57.71%	6.26%	53.37%	62.05%

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 70.** Prueba de medias para los métodos estudiados después de dos minutos de exposición al método correspondiente para análisis estadístico determinado

HB 0.5M	HB 1M	HB1.5 M	HA 0.5M	HA 1M	HA 1.5M	T	Teb	MEC
A	B	C	D	E	F	G	H	I
74.75%	72.00%	0.76%	87.88%	42.92%	0.63%	80.00%	87.19%	98.12%
73.87%	72.97%	0.00%	91.59%	45.19%	0.00%	78.22%	85.24%	95.42%
78.18%	74.24%	0.63%	83.50%	45.13%	0.00%	76.63%	90.40%	94.78%
<b>75.60%</b>	<b>73.07%</b>	<b>0.47%</b>	<b>87.65%</b>	<b>44.42%</b>	<b>0.21%</b>	<b>78.28%</b>	<b>87.61%</b>	<b>96.11%</b>

Fuente: elaboración propia.

Nota: en el cuadro anterior se representa el método de hidrólisis ácida como “HA”, hidrólisis básica como “HB”, lisis por cambios de temperatura por “T”, lisis por exposición a temperatura de ebullición del agua por “Teb” y la lisis mecánica por “MEC”. En la segunda fila del cuadro, se le asignó un código por letra a cada método, el cual se utiliza como representación en los siguientes pasos del análisis estadístico. Los valores presentados en la tabla representan la viabilidad de cada método después de dos minutos de exposición a cada uno, en las tres repeticiones realizadas respectivamente. La última fila, representa la media de la viabilidad de cada método utilizados para el cálculo estadístico realizado.

**Cuadro 71.** *Análisis de varianza a partir de la prueba de medias obtenida para los métodos de lisis realizados*

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
Entre grupos	3.2819965	8	0.4102495	981.94692	3.7294E-22	2.510157
Dentro de los grupos	0.0075202	18	0.0004177	N/A	N/A	N/A
Total	3.2895167	26	N/A	N/A	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Nota: en este cuadro, se obtienen los resultados del análisis de varianza, realizado con Microsoft Excel, en donde se utilizaron las medias presentadas en el cuadro 71.

**Cuadro 72.** *Valor crítico en para prueba de Tukey*

<b>Cálculo</b>	<b>Valor</b>
Valor crítico para prueba de Tukey	0.0584

Fuente: elaboración propia.

**Cuadro 73.** Diferencia de medias entre métodos para prueba de Tukey

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>
<b>A</b>	N/A	0.0253	0.7514	0.1205	0.3119	0.7539	0.0268	0.1201	0.2051
<b>B</b>	N/A	N/A	0.7261	0.1458	0.2866	0.7286	0.0521	0.1454	0.2303
<b>C</b>	N/A	N/A	N/A	0.8719	0.4395	0.0025	0.7782	0.8715	0.9564
<b>D</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	0.4324	0.8744	0.0937	0.0004	0.0845
<b>E</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.4420	0.3387	0.4320	0.5169
<b>F</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.7807	0.8740	0.9590
<b>G</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0933	0.1783
<b>H</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0849
<b>I</b>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Fuente: elaboración propia.

Nota: se utilizó el cálculo 9 para obtener los resultados de este cuadro.

**Cuadro 74.** Resultados de prueba de Tukey

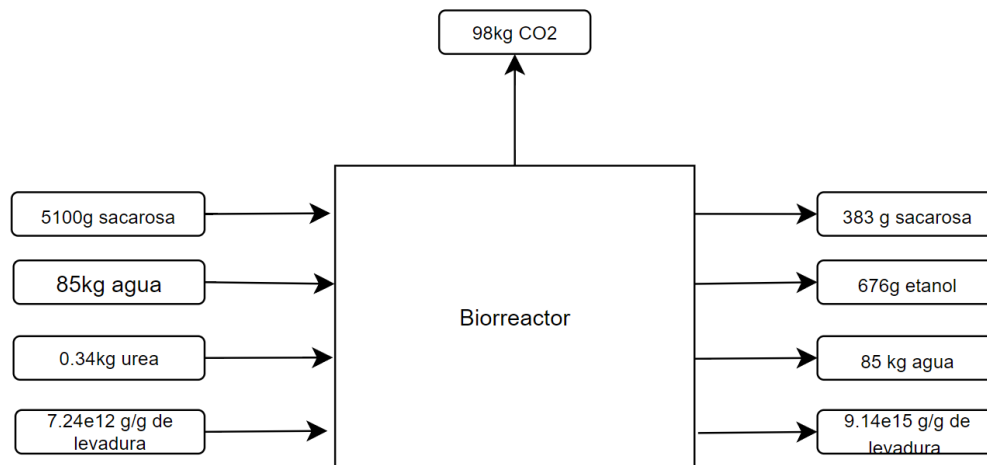
<b>Agrupaciones</b>			
<b>Factor</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>	
I	96.11 %	A	
D	87.65 %	A	B
H	87.61 %	A	B
G	78.28 %	A	B
A	75.60 %	A	B
B	73.07 %	A	B
E	44.42 %	A	
C	0.47 %		B
F	0.21 %		B

Fuente: elaboración propia.

Nota: los resultados obtenidos de las agrupaciones, se obtuvieron al comparar las diferencias de medias con el valor crítico de la prueba de Tukey del cuadro 72.

## Balance de masa

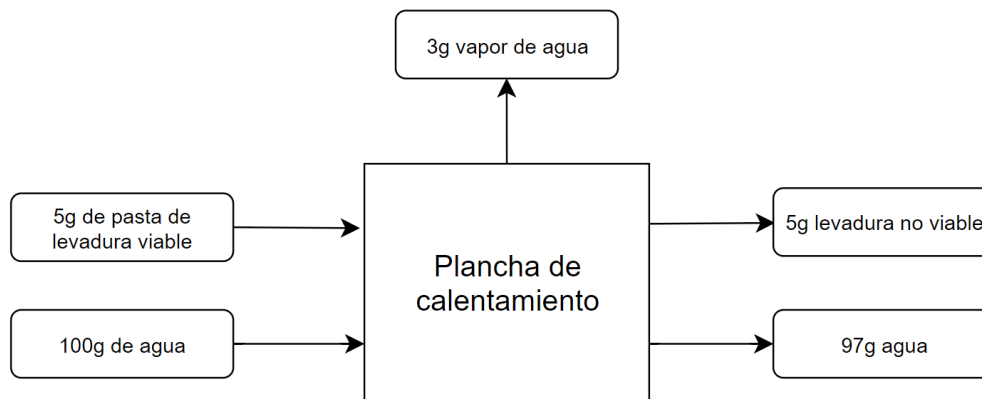
**Figura 24.** Balance de masa de fermentación en biorreactor



Fuente: elaboración propia

Nota: se presenta el balance de masa para el sistema de biorreactor con 85 L litros de medio como paso final en la propagación de *S. cerevisiae*.

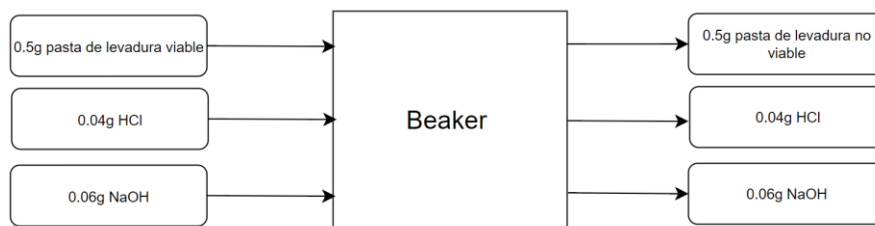
**Figura 25.** Balance de masa para sistema de lisis por cambios de temperatura



Fuente: elaboración propia

Nota: se observa el balance de masa para la lisis celular por cambios de temperatura.

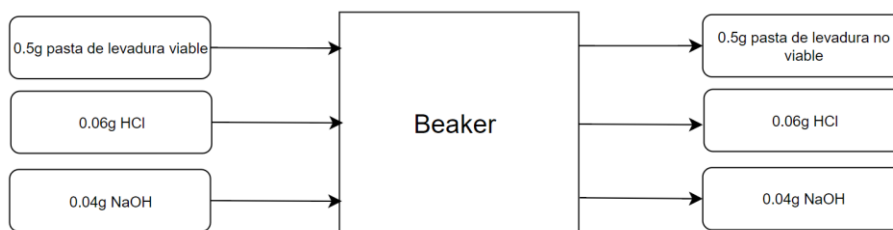
**Figura 26.** Balance de masa para sistema de hidrólisis ácida



Fuente: elaboración propia

Nota: se observa el balance de masa para la hidrólisis ácida utilizando la concentración de 0.5 M para la solución ácida.

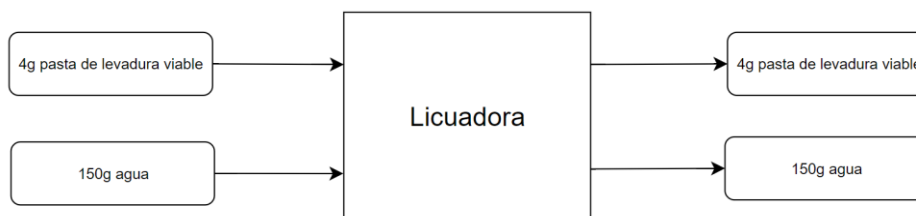
**Figura 27.** Balance de masa para sistema de hidrólisis básica



Fuente: elaboración propia

Nota: se observa el balance de masa para la hidrólisis ácida utilizando la concentración de 0.5 M para la solución ácida.

**Figura 28.** Balance de masa para lisis mecánica



Fuente: elaboración propia

Nota: se presenta el balance de masa para el sistema de lisis mecánica.

## Análisis de error

### Cálculo 6. Media de viabilidad

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{87.88\% + 91.59 + 83.50}{3} = 87.65 \%$$

Nota: se obtiene la media de la viabilidad en las repeticiones de cada método realizado. Para este cálculo de muestra se utilizaron los valores de media obtenidos de cada repetición de la hidrólisis ácida con concentración de 0.5 M. Este se repite para cada método realizado, así como para la obtención de las medias para el análisis estadístico.

### Cálculo 7. Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{(87.88 - 87.65)^2 + (91.59 - 87.65)^2 + (83.50 - 87.65)^2}{3 - 1}} \\ = 4.05 \%$$

Nota: se obtiene el resultado de la desviación estándar de los valores de viabilidad de la hidrólisis ácida a 0.5 M. Este cálculo se repite con todos los resultados de viabilidad de cada método estudiado, con los valores de cada repetición.

### Cálculo 8. Intervalo de confianza

$$I = \bar{X} \pm Z_{\frac{0.05}{2}} * \frac{S}{\sqrt{n}} = 87.65 \pm 1.9599 * \frac{4.05}{\sqrt{3}} = [84.85 \% ; 90.46 \%$$

Nota: Se calcula un intervalo de confianza de los valores de viabilidades de las repeticiones de la hidrólisis ácida a 0.5 M. Estos valores se obtienen para los resultados de viabilidad para cada muestreo de cada método de lisis analizado.

### Cálculo 9. Valor crítico para prueba de Tukey

$$\text{Valor crítico} = vc * \sqrt{\frac{Cme}{r}} = 4.956 * \sqrt{\frac{4.956}{3}} = 0.0584$$

Nota: se calculó el valor crítico necesario para la comparación entre métodos en la prueba de Tukey. En este, “vc” representa el valor crítico en la tabla de Tukey, “Cme” es el valor promedio de los cuadrados entre los grupos y “r” representa la cantidad de repeticiones en cada muestra.

**Cálculo 10.** *Comparación de medias*

$$\text{Comparación de medias} = 0.756 - 73.07 = 0.0252$$

Nota: se realiza el cálculo para obtener la diferencia entre las medias obtenidas en la comparación de medias para la prueba de Tukey del cuadro 70. Este cálculo se repite para comparar todas las medias entre sí. Los resultados de este, se presentan en el cuadro 73.

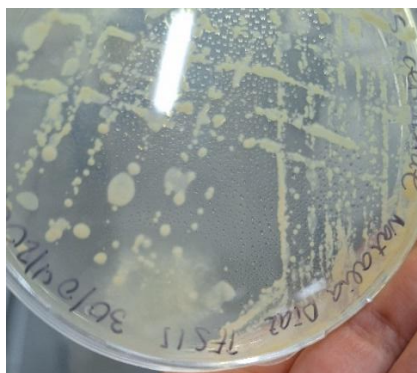
## Fotografías

**Figura 29.** Especificaciones de extracto de levadura para uso en laboratorio

Especificaciones	
Apariencia - color	de color marrón amarillento
- descripción	gránulos
Identidad	se ajusta
Valor pH (2 %; agua)	5,5 - 7,2
N (Nitrógeno) (calculado sobre sustancia seca)	≥ 10,5 %
Cenizas sulfatadas (600 °C)	≤ 17,0 %
Metales pesados (como Pb)	≤ 0,005 %
Pérdida por desecación (50 °C; < 670 Pa; 3 h)	≤ 5,0 %
Ca (calcio)	≤ 0,05 %
Mg (magnesio)	≤ 0,10 %
Cloruro (Cl) (como NaCl)	≤ 5,0 %
Compuestos de fósforo (como P)	≤ 2,5 %
Idoneidad para la microbiología	pasa la prueba

Fuente: (Merck, 2024)

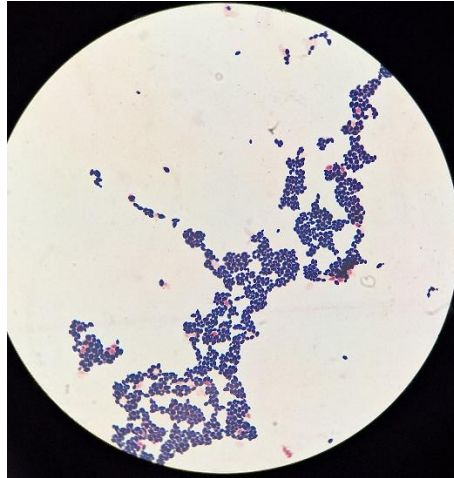
**Figura 30.** Placa de agar PDA de aislamiento de colonias de levadura



Fuente: propia

Nota: tomado en Laboratorio de Procesos Bioindustriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Figura 31.** *Tinción de Gram de cepa de levadura elegida*



Fuente: propia

Nota: obtenida con Microscopio del laboratorio de Procesos Bioindustriales.

**Figura 32.** *Inóculo de levadura para volumen final*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Operaciones Unitarias.

**Figura 33.** *Medio de cultivo recién inoculado para propagación final*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Operaciones Unitarias.

**Figura 34.** *80 L de medio fermentado para propagación de levadura*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Operaciones Unitarias.

**Figura 35.** *Pasta de levadura obtenida*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

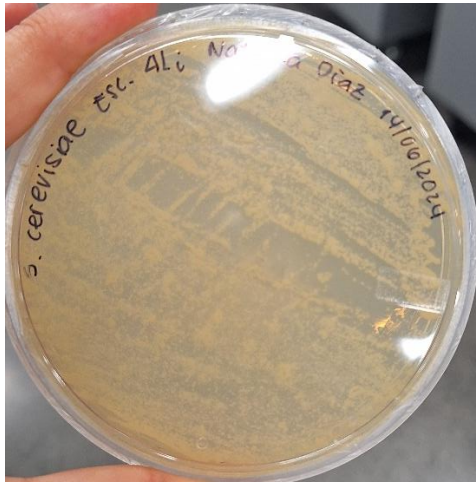
**Figura 36.** *Siembra de levaduras según concentración final en primera fase de propagación*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

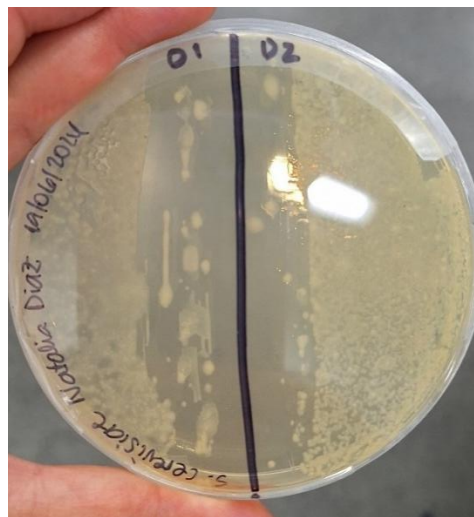
**Figura 37.** Concentración final de inóculo de 4 L



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

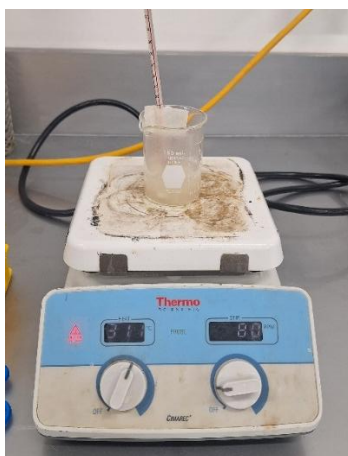
**Figura 38.** Siembra de levaduras después de 1 y dos días de fermentación en reactor de 80 L



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

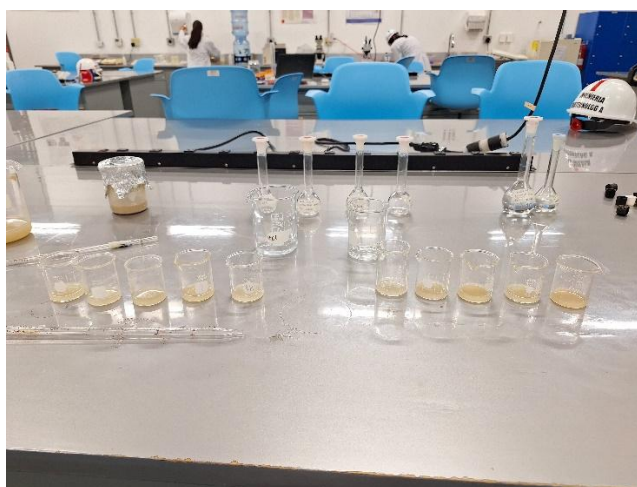
**Figura 39.** Sistema utilizado para lisis por cambios de temperatura



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

**Figura 40.** Sistema utilizado para hidrólisis ácida y básica



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

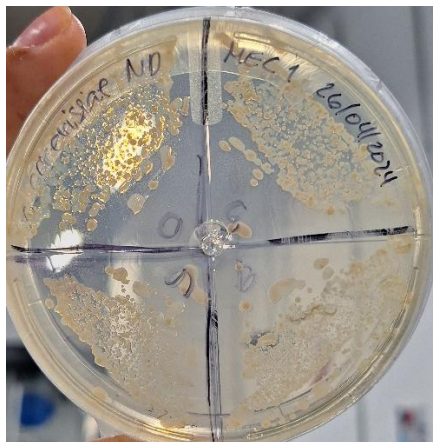
**Figura 41.** *Sistema para conteo de viabilidad con cámara de Neubauer*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

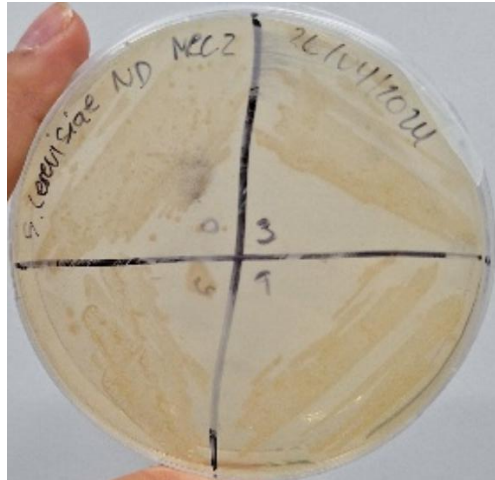
**Figura 42.** *Resultados de siembra de muestras de la primera repetición de lisis mecánica*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

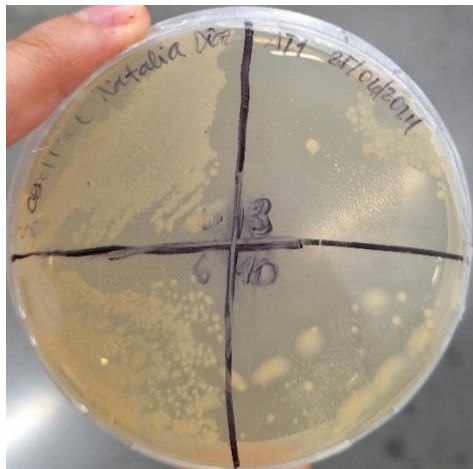
**Figura 43.** Resultados de siembra de muestras de la segunda repetición de lisis mecánica



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

**Figura 44.** Resultados de primera repetición de lisis por cambios de temperatura



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

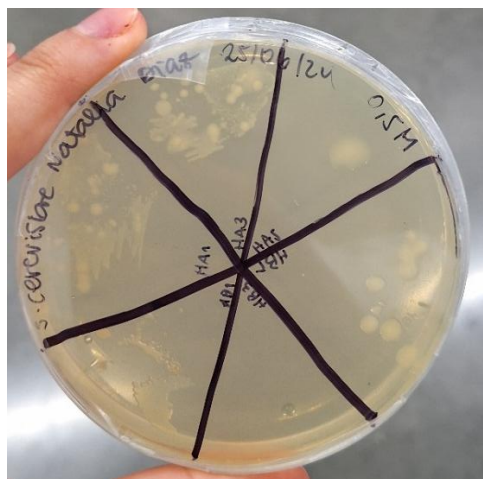
**Figura 45.** Resultados de segunda repetición de lisis por cambios de temperatura



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

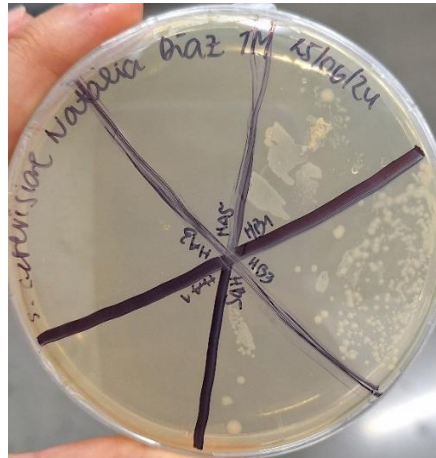
**Figura 46.** Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 0.5 M



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

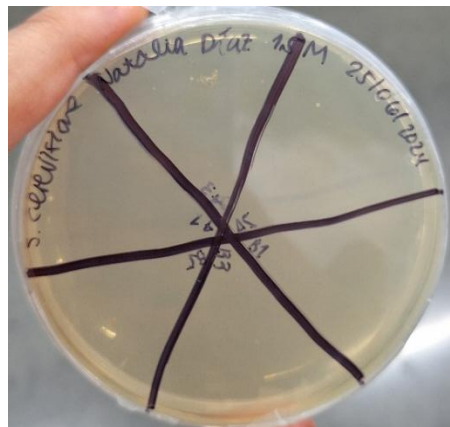
**Figura 47.** Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 1 M



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

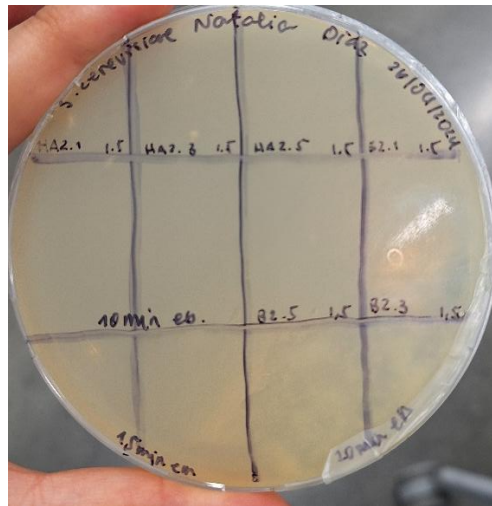
**Figura 48.** Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 1.5 M



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

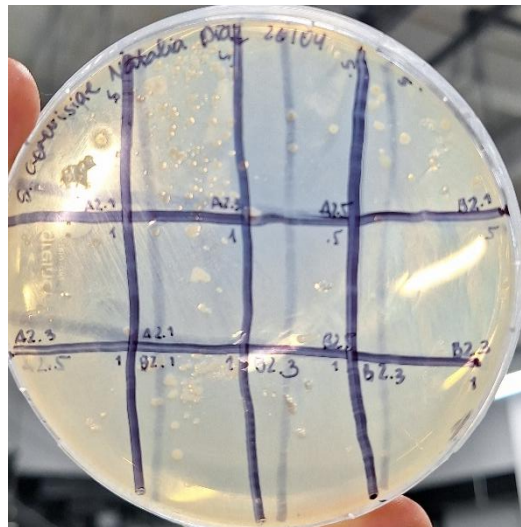
**Figura 49.** Resultados de hidrólisis ácida y básica con soluciones de concentración 1.5M con tiempos menores a 2 minutos y de la lisis por exposición de temperatura de ebullición.



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

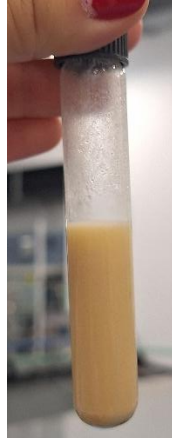
**Figura 50.** Resultados de siembra de muestras para la hidrólisis ácida y básica en tiempos mayores a 10 minutos



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

**Figura 51.** *Solución de extracto de levadura preparada para caracterización de nitrógeno total*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

**Figura 52.** *Comparación colorimétrica de solución preparada con extracto de levadura (derecha) y blanco (izquierda) para análisis de nitrógeno total*



Fuente: propia

Nota: tomada en Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

## **J. Glosario**

Biorreactor: sistema en donde se mantiene un entorno biológicamente activo para inducir procesos bioquímicos, como fermentación.

Cámara de Neubauer: instrumento para la cuenta de células en una muestra líquida, el cual puede definirse como portaobjetos con una cuadrícula grabada.

Caracterización: proceso de descripción y análisis de propiedades de compuestos.

Fermentación alcohólica: proceso metabólico en donde las azúcares se convierten en etanol y dióxido de carbono, en donde se tiene un aumento de biomasa.

Hidrólisis: proceso químico en donde una sustancia descompone por una reacción en presencia de un ácido o base como catalizador.

Lisis celular: proceso de ruptura de la membrana celular, en donde se libera el contenido intracelular en el medio.

Metabolismo celular: conjunto de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula para mantener su viabilidad.

Nitrógeno total: suma de todas las formas de nitrógeno presentes en la muestra.

Propagación de biomasa: proceso de aumento en la cantidad de biomasa en un medio de cultivo normalmente líquido.

Proteína: macromolécula compuesta por cadenas de aminoácidos, con diferentes funciones biológicas.

Tiempo de reacción: tiempo requerido para que una reacción química o biológica alcance un punto específico de progreso, generalmente el equilibrio.

Viabilidad celular: capacidad de células de sobrevivencia, normalmente medido en porcentajes.