



APROVECHAMIENTO DE LA MELAZA DE ALGARROBA PARA LA FERMENTACIÓN DE LEVADURA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2016/17

Alumna: Laura María Montilla Rodrigo

Tutor: Carlos Antonio Blanco Fuentes

Cotutor: José María Giralda Sánchez

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 2 |
| 3. INTRODUCCION | 3 |
| 3.1. Las levaduras y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3 |
| 3.2. Necesidades nutritivas de la levadura de panadería | 3 |
| 3.3. Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5 |
| 3.4. Producción industrial de la levadura..... | 6 |
| 3.5. Modelo de crecimiento..... | 7 |
| 4. OBJETIVOS..... | 10 |
| 5. MATERIALES Y METODOS..... | 11 |
| 5.1. Materiales y equipos | 11 |
| 5.2. Metodología analítica | 12 |
| 5.3. Procedimiento experimental..... | 15 |
| 5.4. Diseño experimental..... | 16 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSION | 22 |
| 6.1. Establecimiento de las condiciones/punto de referencia | 22 |
| 6.2. Efecto de la incorporación de biotina al medio de cultivo | 23 |
| 6.3. Cosecha y rendimiento en función de distintas proporciones de melaza de remolacha y de algarroba | 24 |
| 6.4. Cosecha y rendimiento enriqueciendo el medio de algarroba con distintos nutrientes | 26 |
| 7. CONCLUSIONES | 29 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 30 |
| 9. ANEXO 1. Resultados de los ensayos A1 y A2 y E1-E15..... | 31 |

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que, gracias a su colaboración, han contribuido a la realización de este Trabajo Fin de Máster:

En primer lugar, mi sincero agradecimiento a Carlos Antonio Blanco Fuentes y José María Giralda Sánchez, tutores del presente proyecto, por su constante consejo, ayuda y dedicación durante el desarrollo de este trabajo.

En segundo lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a Lesaffre Ibérica, por haberme dado la oportunidad de realizar el Trabajo Fin de Máster en sus instalaciones y haber permitido en general que este proyecto se llevase a término.

Por último, agradecer a la Universidad de Valladolid y a la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia por impartir el Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos en general, y por darme la oportunidad de desarrollar el Trabajo Fin de Máster en particular.

1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio es determinar si la melaza de algarroba es apta como sustrato en la producción de levadura de panadería. Para ello, se realizan varios experimentos a nivel de laboratorio, empleando levadura seca instantánea y realizando siembras de 1,5 g de levadura en matraces con 350 g de medio de cultivo estéril. El medio de cultivo base empleado lleva 125 g/kg de melaza y una suplementación de sulfato amónico y fosfato diamónico.

Con estos experimentos se pretende conocer la biomasa de levadura producida en gramos, definida como cosecha, y el rendimiento, obtenidos con distintas composiciones del medio de cultivo. En concreto, se realizan pruebas para establecer estos dos parámetros bajo unas condiciones de referencia, empleando melaza de remolacha. También se prueban distintas concentraciones crecientes de melaza de algarroba en combinación con melaza de remolacha y, por último, se prueban distintas combinaciones de nutrientes (biotina, potasio, magnesio, hierro y extracto de levadura) en un medio con melaza de algarroba.

Los resultados muestran que la melaza de algarroba puede ser empleada como fuente de carbono en la producción de levadura de panadería. Si se desea obtener una cosecha y rendimiento similares a los obtenidos con melaza de remolacha, la cantidad máxima de melaza de algarroba es del 60%. Se puede llevar a cabo una fermentación empleando únicamente melaza de algarroba, obteniendo una cosecha y rendimiento significativamente inferiores. Al suplementar el medio de cultivo con biotina, potasio, magnesio, hierro y extracto de levadura, no se advierte un efecto significativo en la cosecha. No obstante, sí que se observa una disminución significativa de la cosecha y rendimiento al eliminar el magnesio y el extracto de levadura.

2. ABSTRACT

The aim of the present study was to determine if the locust-bean molasses is suitable as substratum for bakery yeast production. Several experiments were realized in the laboratory to achieve this objective, using dry instantaneous yeast and inoculating 1,5 g of yeast in flasks with 350 g of sterile culture medium. The basic culture medium contained 125 g/kg of molasses and was complemented with ammonium sulfate and diammonium phosphate.

These experiments tried to know the biomass of yeast produced measured in grams, this is defined as crop, and the yield, obtained with different compositions of the culture medium. In particular, tests were realized to establish these two parameters with a reference conditions, using beet molasses. Also, different increasing concentrations of locust-bean molasses in combination with beet molasses were tried and, finally, different combinations of nutrients (biotin, potassium, magnesium, iron and yeast extract) were tried in a culture medium with locust-bean molasses.

The results showed that the locust-bean molasses can be used as a source of carbon in bakery yeast production. If we want a crop and a yield similar to those obtained with beet molasses, the maximum quantity of locust-bean molasses must be 60%. It is possible to carry out a fermentation using only locust-bean molasses, obtaining a significantly lower crop and yield. Complementing the culture medium with biotin, potassium, magnesium, iron and yeast extract doesn't have a significant effect in the crop. Nevertheless, if the magnesium and the yeast extract are eliminated of that culture medium, it is observed a significant decrease of the crop and yield.

3. INTRODUCCION

3.1. Las levaduras y *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son un grupo particular de hongos unicelulares, caracterizados por su capacidad para consumir glucosa ya sea por fermentación o respiración, a fin de generar energía. (Calaveras, 2004).

El número de especies fúngicas reconocido en la actualidad supera los 50 000, de los cuales sólo 39 géneros y 350 especies se catalogan como levaduras. Por tanto, sólo una pequeña fracción dentro del reino de los hongos corresponde a las levaduras, las cuales han perdido la morfología micelial (Lee, 2000).

Las levaduras se emplean por su capacidad fermentativa, transforman almidón o azúcares y dan lugar a dióxido de carbono y alcohol, importantes en la industria de panificación, cervecera o vinícola (Lee, 2000). La levadura más utilizada en los procesos de fermentación industrial es *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae puede adaptarse a diferentes medios y sobrevivir en condiciones que se consideran desfavorables para este microorganismo. Puede vivir en presencia o ausencia de oxígeno según la ruta metabólica que siga la célula (ver punto 3.4. *Metabolismo y vías metabólicas de la levadura*) y es capaz de desarrollarse en ambientes con carencia de nutrientes, deshidratados o con ciertos agentes químicos, factores que inducen la creación de formas de resistencia.

En cuanto a su mecanismo de reproducción, *S. cerevisiae* es capaz de reproducirse tanto asexualmente (gemación y fisión binaria) como sexualmente. (Lee, 2000).

3.2. Necesidades nutritivas de la levadura de panadería

Las exigencias nutricionales de la levadura de panadería son diferentes desde el punto de vista cualitativo, según requiera fermentar una masa, o bien multiplicarse para producir biomasa. En este último caso, además de una fuente de carbono abundante, hace falta incorporar nitrógeno, sales minerales, vitaminas y oligoelementos, para responder así a la importante demanda de síntesis de proteínas (Calaveras, 2004).

Los únicos azúcares que la levadura fermenta normalmente de una manera directa son glucosa y fructosa. Estos dos azúcares derivan de la acción de enzimas sobre moléculas más complejas, como la sacarosa, maltosa y almidón. En la fabricación industrial, se proporciona esencialmente la sacarosa contenida en la melaza de caña o

de remolacha, adquirida en las industrias azucareras. Por tanto cabe destacar la importancia de la enzima invertasa, responsable de la ruptura de la sacarosa en glucosa y fructosa (Calaveras, 2004). La levadura también es capaz de consumir el etanol produciendo, ácido acético, piruvato, lactato y glicerol. (Papagianni et al., 2007).

Las melazas, líquidos viscosos y altamente coloreados, son el sustrato más utilizado en la producción de levadura de panadería. Tienen en torno a un 70-80% de materia seca y su fuente principal de carbono es la sacarosa, en torno a un 50%, el contenido depende del origen de la melaza. Además, aportan minerales, oligoelementos y vitaminas, siendo limitante normalmente la cantidad de fósforo, magnesio y zinc. Debido a su deficiencia en nitrógeno y fósforo, deben ser suplementadas con sales amoniacales y ácido ortofosfórico u otras formas de fosfato. La composición de las melazas varía según su origen, modo de cultivo y el proceso industrial de obtención de azúcar que se ha llevado a cabo. Por ello, la melaza empleada es uno de los factores más importantes a tener en cuenta y supone un reto para los fabricantes de levadura, su objetivo es producir levadura con una calidad constante a pesar de las posibles variaciones de la materia prima (Calaveras, 2004).

En cuanto a minerales y oligoelementos, potasio, sodio, magnesio, azufre, hierro, cobre y zinc son igualmente necesarios. Las carencias de algunos de estos elementos son responsables de problemas ligados al poder fermentativo de la levadura resultante (Calaveras, 2004).

De entre las vitaminas, seis vitaminas del grupo B se han identificado como factores de crecimiento de la levadura: biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, piridoxina y niacina. La capacidad de crecer en medios libres de vitaminas es variable, lo que implica que algunas cepas sean auxótrofas y otras no. Sin embargo, aunque no existan requerimientos absolutos, la presencia de vitaminas en el medio estimula el crecimiento e incrementa la productividad (Calaveras, 2004).

La auxotrofia más común es por biotina, aunque algunas cepas presentan también auxotrofia por ácido pantoténico, niacina, tiamina o inositol. Cuando *S. cerevisiae* crece en condiciones estrictamente anaerobias existe también un requerimiento absoluto por ergosterol y otros esteroides, ácidos grasos insaturados y ácido nicotínico. Estos requerimientos no se manifiestan cuando la levadura crece en condiciones aerobias o microaerófilas, ya que con la presencia de oxígeno en concentraciones superiores a 1 ppm, el microorganismo es capaz de sintetizar estos nutrientes. La anaerobiosis absoluta en ausencia de estos compuestos provoca una baja producción de alcohol, pobre viabilidad e imposibilidad de seguir creciendo (Garibay et al., 2004).

3.3. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

Según se encuentre en presencia o ausencia de oxígeno, el rendimiento energético de la metabolización de azúcares es diferente, ya que *S. cerevisiae* sigue vías metabólicas distintas.

- Metabolismo respiratorio de la glucosa



Hay una concentración de oxígeno suficiente en el medio y se produce una elevada cantidad de energía. Se pueden llegar a producir 0,5 gramos de biomasa por cada gramo de glucosa metabolizado. Esta es la vía metabólica empleada en la producción industrial de levadura, con la que se obtiene una elevada cantidad de biomasa con un alto rendimiento y una baja producción de etanol.

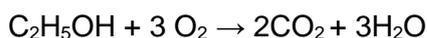
- Metabolismo fermentable de la glucosa



Cuando la concentración de glucosa es suficientemente alta o el nivel de oxígeno disponible es insuficiente, la levadura fermenta la glucosa produciendo etanol. Se produce una baja cantidad de energía, relacionada con una baja producción de biomasa y alta producción de etanol.

S. cerevisiae puede también puede producir etanol cuando la concentración de glucosa es superior a 110 mg/l en un medio aeróbico (la oxidación se suprime). Este fenómeno se conoce como efecto Cabtree. Este efecto es indeseable durante la fase de propagación industrial de levadura porque reduce el rendimiento de la biomasa en relación a la adición de carbohidratos. Por este motivo se emplean unas condiciones de cultivo *fed-batch*, de esta manera se delimita la alimentación de azúcar en condiciones aeróbicas. (Miskiewicz & Kasperski, 2000; Van Hoek et al., 2000).

- Metabolismo respiratorio de etanol



Cuando se acaba la glucosa del medio, el etanol producido en fase fermentable puede ser consumido en presencia de oxígeno. De esta manera se obtienen 0,55 gramos de levadura por cada gramo de etanol metabolizado.

La levadura es capaz de almacenar energía en forma de azúcares de reserva, como glucógeno y trealosa. Este proceso es más eficiente en presencia de oxígeno que en anaerobiosis. El momento de acumulación máxima de azúcares por parte de la célula de levadura coincide con el momento inmediatamente anterior a la gemación.

3.4. Producción industrial de la levadura

La producción de levadura a escala industrial se lleva a cabo en las siguientes etapas:

- Aislamiento de la cepa. Esta etapa se realiza en laboratorio en condiciones de estricta esterilidad. Se selecciona la cepa por sus cualidades de interés, como puede ser el poder fermentativo, estabilidad en la multiplicación y conservación de las principales características en las células hijas (Calaveras, 2004).

- Preparación, clarificación y esterilización de la melaza, con el fin de homogeneizar la composición del medio nutritivo y limitar los peligros de toxicidad. Las melazas pueden contener fungicidas, insecticidas, herbicidas, metales pesados o fertilizantes. Una práctica común para atenuar los efectos tóxicos es mezclar diferentes muestras para diluir potenciales toxinas (Pérez-Torrado et al., 2015).

- Propagación de la levadura

- Producción de levadura madre mediante cultivo en *batch*, en el que el medio nutritivo se suministra una sola vez. Esta fase se realiza en varias etapas a nivel de laboratorio, transfiriendo sucesivamente el contenido a fermentadores de un tamaño superior, en medios estériles, poco aireados y con exceso de nutriente carbonatado, de esta manera se consigue que la levadura fermente los azúcares y produzca etanol. Una vez finalizada esta fase se consigue suficiente biomasa para la producción de levadura comercial.

- Adaptación a aerobiosis mediante cultivo en *fed-batch*, en el que los nutrientes se van añadiendo a medida que aumenta la población de levadura. Es la última fase de preparación de levadura madre. Se comienza en anaerobiosis y se va aumentando la aireación paulatinamente, hasta una cantidad limitada que no impida el desarrollo de la fermentación alcohólica, necesaria para la síntesis de algunas enzimas de interés. Al final de esta etapa la levadura se concentra por centrifugación, formando lo que se conoce como crema de siembra.

- Propagación industrial mediante cultivo en *fed-batch*. Esta fase se lleva a cabo en tanques de acero inoxidable de hasta 200 m³ que disponen de un sistema de aireación, los cuales se siembran con la levadura obtenida en la fase anterior. Un tiempo de fermentación de aproximadamente 18 horas permite la producción de 25 a

30 toneladas de levadura comercial a partir de 3 toneladas de levadura madre. El objetivo de esta etapa es conseguir un número elevado de levaduras viables con un equilibrio óptimo de propiedades, confiriendo una composición bioquímica y un estado fisiológico que permitan satisfacer las exigencias del productor y consumidor, como puede ser un elevado poder fermentativo o que permitan un almacenamiento adecuado.

Finalmente, después de la separación del medio de fermentación mediante centrifugación, se obtiene una suspensión de levadura en agua, que puede suministrarse al cliente en forma de levadura líquida, levadura prensada, levadura seca activa o levadura seca instantánea.

Durante todo el proceso de obtención de levadura se realizan constantes controles de calidad que pasan por estabilizar la temperatura, pH, niveles nutritivos de los cultivos, humedad, poder fermentativo y controlar la presencia de mohos en el producto final. Además, se controlan factores como el color, olor y velocidad de fermentación entre otros, que determinarán la calidad comercial de la levadura (Calaveras, 2004).

3.5. Modelo de crecimiento

En un cultivo discontinuo o *batch*, los microorganismos son inoculados dentro de un volumen fijo de medio y, a medida que se produce el crecimiento, los nutrientes se consumen y se acumulan los productos del crecimiento: biomasa y metabolitos. El entorno con los nutrientes dentro del biorreactor cambia continuamente, lo que a su vez impone cambios en el metabolismo celular. Eventualmente, la multiplicación celular cesa debido a que los nutrientes se vuelven limitantes o se agotan y debido también a la acumulación de productos de desecho tóxicos excretados (Smith, 2004). En el cultivo en discontinuo se observan las siguientes fases de crecimiento microbiano:

- Fase de latencia: el microorganismo se adapta al ambiente, no hay aumento de biomasa. La duración de esta fase depende de las condiciones del inóculo y su concentración.

- Fase logarítmica/exponencial: el microorganismo ya está adaptado al ambiente. En esta fase existe exceso de sustrato y la velocidad de crecimiento es constante.

- Fase estacionaria: la biomasa aumenta ligeramente o permanece constante. El sustrato ha sido metabolizado y como resultado se han producido metabolitos tóxicos.

- Fase de muerte celular: por agotamiento de las reservas energéticas celulares.

El conocimiento de la velocidad de crecimiento microbiano en la fase exponencial es indispensable para optimizar el proceso de producción de levadura. Esta fase, en la que cada microorganismo se divide a intervalos constantes, se puede describir mediante la ecuación: (Prescott et al., 2004;)

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad \text{Ec. 1}$$

Donde x es la concentración de células (mg/cm^3), t es el tiempo de incubación (h) y μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Al ser μ constante durante la fase de crecimiento exponencial, esta ecuación se puede integrar obteniéndose como resultado:

$$x_t = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Ec. 2}$$

La cual también se puede expresar en su forma logarítmica como:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu \cdot t \quad \text{Ec. 3}$$

Durante la fase exponencial de crecimiento la velocidad específica de crecimiento es constante y máxima en las condiciones de incubación, ésta se denomina velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) (Peña y Arango, 2008).

Además, el crecimiento de un microorganismo en un cultivo puede describirse empleando el término “tiempo de duplicación” o “tiempo de generación”, que se define como el tiempo necesario para que una célula se divida. La población se duplica en cada generación, por lo que su incremento es exponencial (2^n) donde n es el número de generaciones. De esta forma se obtiene:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n \quad \text{Ec. 4}$$

Donde N_0 es el número inicial de células en el cultivo y N_t es la población obtenida en un tiempo t .

No obstante, en las ecuaciones 2 y 4 no se considera el hecho de que el crecimiento celular implica el agotamiento de nutrientes y acumulación de metabolitos tóxicos. A

medida que se agota el sustrato y se acumulan estos subproductos, la velocidad específica de crecimiento se desvía del valor máximo, entrando en la fase estacionaria. La disminución de esta velocidad de crecimiento y del crecimiento debido al agotamiento del sustrato se puede describir mediante una relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración residual del sustrato limitante, dando lugar a la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad \text{Ec.5}$$

Donde [S] es la concentración residual del sustrato limitante y K_s es la constante de saturación para el sustrato limitante (equivale a la concentración del sustrato cuando la velocidad específica de crecimiento, μ , es la mitad de la velocidad específica de crecimiento máxima, $\mu_{m\acute{a}x}$) (Lee, 200)

En conclusión, se puede optimizar la producción industrial de levadura de panificación interviniendo en las distintas condiciones de fabricación. En concreto, en este trabajo se prueba a sustituir la fuente de carbono empleada habitualmente en la producción industrial de levadura de panadería (melaza de remolacha) por melaza de algarroba.

La melaza de algarroba es un subproducto que se obtiene en el proceso de extracción de compuestos de interés del fruto del algarrobo, como son el D-pinitol (a partir de las vainas) o la goma garofín (a partir de las semillas). El D-pinitol es un producto de interés en la industria farmacéutica por su efecto beneficioso en cuanto al metabolismo de la glucosa, así como por su capacidad para incrementar el rendimiento deportivo. El proceso de obtención del D-pinitol a partir del fruto sin semillas del algarrobo se realiza mediante un procedimiento físico de separación cromatográfica, en el que no se emplean disolventes.

Como consecuencia de esta actividad, se generan grandes cantidades de melaza de algarroba. Por ello se considera oportuno estudiar la posible incorporación de esta melaza como sustrato para la producción de levadura de panadería.

4. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo general dilucidar si la melaza de algarroba es apta como fuente de carbono en la producción industrial de levadura de panadería.

Los objetivos concretos han sido:

- Calcular la cosecha de levadura y el rendimiento de fermentación que se obtienen bajo unas condiciones estándar de fermentación a nivel de laboratorio. Para ello se empleará melaza de remolacha como fuente de carbono y los nutrientes empleados de manera ordinaria en la producción industrial de levadura, siendo éste el punto de referencia para los experimentos posteriores.

- Establecer cuál es la proporción de melaza de remolacha y de algarroba que permite obtener una cosecha de levadura y rendimiento de fermentación idóneos.

- Determinar si la adición de determinados nutrientes complementarios a la preparación habitual del medio de cultivo tiene un efecto significativo sobre la cosecha de levadura y el rendimiento de la fermentación. Este aspecto se estudiará en un medio de cultivo cuya fuente de carbono procede íntegramente de la melaza de algarroba.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Materiales y equipos

- **Materiales**

(NH₄)₂SO₄ al 99%, SCHARLAU

(NH₄)₂HPO₄ al 98%, SCHARLAU

.KH₂PO₄ al 99%, PANREAC

MgSO₄.7H₂O al 98-102%, PANREAC

(NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6H₂O al 98-101%, SCHARLAU

Biotina (d-Biotin), SDM

Antiespumante Bioespumex 200k, OUVRIE PMC

Extracto de levadura LESAFFRE

Levadura seca rápida LESAFFRE

Melaza de remolacha, mezcla estándar de remolacha nacional

Melaza de algarroba, BIOSEARCH S.A., Peñafiel

Matraces SIMAX 500 ml

Filtros ROBU® VitraPOR 50 ml, Por.5

Pipetas VWR 10 ml

Tapones de algodón

Vasos de precipitados de 600 ml ENDO

Vasos de precipitados de 2000 ml NAHITA

Varilla de cristal

Vidrios de reloj

Cinta indicadora de esterilización

- **Equipos**

pH-metro CRISON GLP 2², nº serie 151006

Agitador magnético P-SELECTA AGIMATIC Ref. 243 400 W

Balanza SARTORIUS BL1500S

Balanza de precisión METTLER TOLEDO NewClassic MS 204S/01

Autoclave de vapor, fabricación propia

Plataforma agitadora con sistema de incubación HEIDOLPH Unimax 1010 + HEIDOLPH incubator 1000, nº serie: 30728

Campana de flujo laminar GELAIRE TC48

Sistema de filtrado a vacío:

- Matraces Kitasato SCHOTT DURAN 1000 ml
- Bomba TST 2-Stage Vacuum Pump tst-26N
- Campana FORMIMETAL NUBLAR NBL 1600 nº serie: 007/05/10
- Refractómetro ATAGO® Pocket PAL-S

5.2. Metodología analítica

Todos los análisis que se muestran a continuación se realizaron por duplicado.

5.2.1. Medida del pH

Las medidas del pH se efectuaron antes de la esterilización, antes de la siembra, y una vez terminada la fermentación. También se midió el pH de cada una de las melazas diluidas al 50%.

5.2.2. Medida del Brix

La medida del grado Brix se realizó con el refractómetro en las mismas muestras sobre las que midió el pH: medios de cultivo antes de la esterilización, antes de la siembra, tras la fermentación y melazas diluidas al 50%.

5.2.3. Medida del peso

Los matraces con el medio de cultivo se pesaron antes y después de esterilizar para comprobar si la esterilización provocaba variaciones en el peso del medio. También se pesaron tras la fermentación, esta medida se utilizó en el cálculo de la concentración de levadura.

5.2.4. Medida del alcohol. Método Martin

La medida del alcohol se realizó sobre las muestras fermentadas. Este método consiste en la destilación de 10 ml de muestra sobre dicromato potásico y ácido

sulfúrico al 96%, y su posterior valoración con sulfato ferroso amónico (sal de Möhr), empleando ferroína como indicador.

5.2.5. Determinación de materia seca

Para realizar el análisis de materia seca se pesaron 0,5 gramos de levadura en un pesasustancias y se llevaron a la estufa de desecación a 105°C durante 7 horas. Tras medir la diferencia de peso antes y después de la desecación, se calculó la materia seca de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Materia seca (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P} \cdot 100$$

Siendo:

- P₁: pesasustancias vacío (g)
- P₂: pesasustancias con la muestra tras 7 horas a 105°C (g)
- P: gramos de muestra iniciales

5.2.6. Determinación de la concentración de levadura L₃₂

El Grupo Lesaffre emplea el estándar levadura al 32% de materia seca (L₃₂) para unificar los cálculos. Para determinar la concentración de levadura L₃₂ se filtraron a vacío 5 gramos de las muestras fermentadas, el filtro con el retenido se llevó a la estufa de 105°C durante 7 horas y tras la desecación se midió la diferencia de peso. La concentración se obtuvo mediante la expresión:

$$\text{Concentración levadura L}_{32} \text{ (g/kg)} = \frac{T_2 - T_1}{PE \cdot 0,32} \cdot 1000$$

Siendo:

- T₁: peso del filtro vacío (g)
- T₂: peso del filtro con el residuo seco (g)
- PE: gramos de muestra iniciales

5.2.6. Medida de melaza al 50%

Todas las medidas empleadas de melaza se pasaron a cantidad de melaza al 50% (melaza cuyo contenido en azúcares totales es del 50%) de esta manera se unificaron todos los resultados. Para ello, se partió de los análisis facilitados por el Grupo Lesaffre de cada uno de los sustratos empleados, en los cuales figuraba que la melaza de remolacha tiene 50,34% de azúcares totales, mientras que la de algarroba tiene 62,50%.

En primer lugar fue necesario saber la cantidad de melaza bruta que hay que añadir al medio para obtener un Brix de 10. Para ello se realizaron varias pruebas, pesando una cantidad de melaza y llevándola a un kilo de disolución final con agua destilada, de la cual se tomó la medida del Brix. De esta manera se hizo una estimación de la cantidad final de melaza (g/kg) que se iba a emplear para elaborar los medios de cultivo. El resultado fue de 125 g/kg de melaza. Sabiendo este dato, se pudo calcular la cantidad de melaza 50% equivalente a la cantidad de melaza de remolacha y algarroba empleadas.

Tabla 1. Equivalencia entre la cantidad de melaza bruta de remolacha y algarroba y la melaza al 50% de azúcares totales

| MELAZA | CANTIDAD DE MELAZA BRUTA (g/kg) | AZUCARES TOTALES (%) | AZUCARES TOTALES (g/kg) | CANTIDAD DE MELAZA AL 50% (g/kg) |
|-----------|---------------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------------------|
| REMOLACHA | 125 | 50,34 | 62,93 | 125,85 |
| ALGARROBA | 125 | 62,50 | 78,13 | 156,26 |

Estos son los resultados aplicados a lo largo del estudio con los dos tipos de melazas y ajustando con los porcentajes de cada una de ellas en los distintos ensayos.

5.2.7. Cálculo de cosecha y rendimiento

- Para el cálculo de la cosecha se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Cosecha } L_{32} (g) = \text{Concentración } L_{32} (g/kg) \cdot \text{Medio de cultivo (kg)}$$

Se entiende como cosecha los gramos de biomasa obtenidos en un matraz tras la fermentación.

- Para el cálculo del rendimiento se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\text{Rendimiento total (\%)} = \frac{\text{Cosecha } L_{32}(g)}{\text{Melaza al 50\% (g)}}$$

$$\text{Rendimiento de fermentación (\%)} = \frac{\text{Cosecha } L_{32}(g) - \text{Siembra } L_{32}(g)}{\text{Melaza al 50\% (g)}}$$

Fue preciso analizar la materia seca de la levadura empleada en todos los ensayos para poder expresar correctamente los resultados. Se obtuvo un 96,06% de materia seca. De este modo, si se siembra una cantidad aproximada de 0.5 gramos de levadura seca instantánea, que tiene a su vez una materia seca del 96,06%, éstos se corresponden con 1.51 gramos de levadura L_{32} .

5.3. Procedimiento experimental

El medio de cultivo se preparó con 125 g/kg de melaza y con los distintos nutrientes adicionales específicos de cada ensayo, llevándolo a un peso final con agua destilada. El grupo Lesaffre emplea la media por pesada debido a su operatividad y rapidez. En los distintos matraces había una cantidad final de 350 g de medio de cultivo.

Se estableció como medio de cultivo estándar aquel con 125 g de melaza, fosfato diamónico, sulfato amónico y antiespumante. Estos sustratos son los que emplea el Grupo Lesaffre a la hora de preparar fermentaciones a pequeña escala. Se incorporó antiespumante a todos los medios de cultivo, éste actúa como coadyuvante y es necesario para que se desarrolle correctamente el proceso fermentativo, evitando así desbordamientos.

Se colocó un tapón de algodón en cada matraz (elaborado con gasas y algodón) para crear un ambiente de microaerofilia en el mismo. A continuación los matraces se cubrieron con papel de aluminio y se colocó cinta indicadora para la esterilización.

El ciclo de esterilización aplicado fue de 10 minutos a 121°C. Una vez esterilizados, los matraces se atemperaron hasta la temperatura a la cual se desarrolla la fermentación (26°C). Tras pesar el matraz después de la esterilización, se realizó la siembra de levadura en la campana de flujo laminar.

Una vez sembrados, los matraces se colocaron en el sistema de incubación con agitación orbital en las condiciones establecidas (26°C y 220 rpm). Al finalizar el tiempo de incubación establecido (16 horas), los matraces se pesaron y se procedió a realizar las medidas del Brix, alcohol, concentración de levadura y pH.



Figura 1. Equipo de incubación HEIDOLPH incubator 1000 con sistema de agitación HEIDOLPH Unimax 1010

5.4. Diseño experimental

Antes de presentar la batería de experimentos, es necesario explicar las pruebas previas que se llevaron a cabo para determinar el tiempo de incubación, así como la cantidad de levadura L₃₂ que hay que sembrar, de tal modo que al final de ese tiempo de incubación se hayan consumido todos los azúcares del medio:

- Para determinar la siembra de levadura necesaria, se hicieron dos pruebas con el medio de cultivo estándar con melaza de remolacha:
 - Una primera prueba P1 en la que se probó una siembra de 0,06, 0,15 y 0,30 g de levadura L₃₂. Tras 16 horas de incubación no se observó desarrollo de proceso fermentativo. Apenas hubo diferencia de peso entre el medio junto con la siembra antes y después de la incubación, del mismo modo que con la producción de alcohol y con la variación del Brix: no ha hubo consumo de azúcares.

Tabla 2. Resultados de los análisis de la prueba P1 realizados tras una incubación de 16 horas

| Siembra levadura L ₃₂ (g) | Variación de masa de cultivo (g) | Alcohol (ml/l) | ° Brix |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------|--------|
| 0,06 | 0,06 | 0 | 10,8 |
| 0,15 | 0,33 | 0,3 | 10,2 |
| 0,30 | 0,24 | 2,1 | 9,9 |

- Tras comprobar que las anteriores siembras fueron adecuadas para desarrollar una fermentación, se realizó una segunda prueba P2 en la que se aumentó la cantidad de siembra a 1,50, 3 y 6 g.

Tabla 3. Resultados de los análisis de la prueba P2 realizados tras una incubación de 16 horas

| Siembra levadura L ₃₂ (g) | Variación de masa de cultivo (g) | Alcohol (ml/l) | ° Brix | Concentración de levadura (g/kg) | Cosecha L ₃₂ | Levadura L ₃₂ producida (g) |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------|--------|----------------------------------|-------------------------|--|
| 1,50 | 9,69 | 7,20 | 6,40 | 21,40 | 7,28 | 5,78 |
| 3,00 | 9,15 | 6,90 | 6,40 | 24,95 | 8,51 | 5,50 |
| 6,01 | 8,23 | 6,30 | 6,50 | 30,91 | 10,57 | 4,56 |

Se puede obtener la cosecha teórica que cabe esperar con la levadura L₃₂, sabiendo que ésta puede llegar hasta un rendimiento teórico del 20% empleando melaza de

remolacha. De esta manera se obtiene como resultado 8,81 g de levadura L₃₂ esperables en cada matraz. Posteriormente se comprobó que el rendimiento en realidad es inferior, en torno a 16,5%. Empleando este rendimiento, el resultado es de 7,27 gramos de levadura L₃₂ esperables en cada matraz.

Partiendo de los resultados obtenidos, se determinó que la cantidad idónea a sembrar en cada matraz es de 1,50 g de levadura L₃₂. En la Tabla 3 se observa que con las tres siembras de la prueba P2 la cosecha aumenta tras 16 horas de incubación. No obstante, se utilizó la cantidad de siembra más baja: de esta manera se consigue mantener el estado enzimático de la levadura lo más activo posible.

Además, atendiendo al resto de indicadores, se comprueba que en la prueba P2 sí se ha desarrollado fermentación: hay producción de alcohol y una disminución del peso del medio y del Brix.

- Una vez establecida la cantidad de levadura L₃₂ que hay que sembrar en cada matraz, se determina el tiempo de incubación en las condiciones preestablecidas (26° C, 220 rpm, 10° Brix y microaerofilia). Para ello se llevan a cabo dos ensayos (A1 y A2), los cuales consisten en determinar la cosecha a las 10, 12, 14 y 16 horas de fermentación (se busca obtener resultados de final de la fermentación). Se emplea el medio de cultivo estándar con melaza de remolacha (A1) y con melaza de algarroba (A2). De este modo se puede estimar el momento final de la fermentación, obteniéndose una medida de la cosecha estable conforme aumenta el tiempo de incubación.

Tabla 4. Ensayos para determinar la cosecha y rendimiento a distintos tiempos de fermentación con melazas de remolacha (A1) y algarroba (A2)

| | Horas fermentación | MELAZA DE REMOLACHA (%) | MELAZA DE ALGARROBA (%) | COSECHA L ₃₂ (g) | RENDIMIENTO TOTAL (%) |
|----|--------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | 0 | | | 1,51 | |
| A1 | 10 | 100 | 0 | 6,87 | 15,59 |
| | 12 | 100 | 0 | 7,64 | 17,35 |
| | 14 | 100 | 0 | 7,65 | 17,36 |
| | 16 | 100 | 0 | 7,80 | 17,71 |
| A2 | 10 | 0 | 100 | 2,27 | 4,15 |
| | 12 | 0 | 100 | 2,22 | 4,06 |
| | 14 | 0 | 100 | 2,31 | 4,22 |
| | 16 | 0 | 100 | 2,49 | 4,56 |

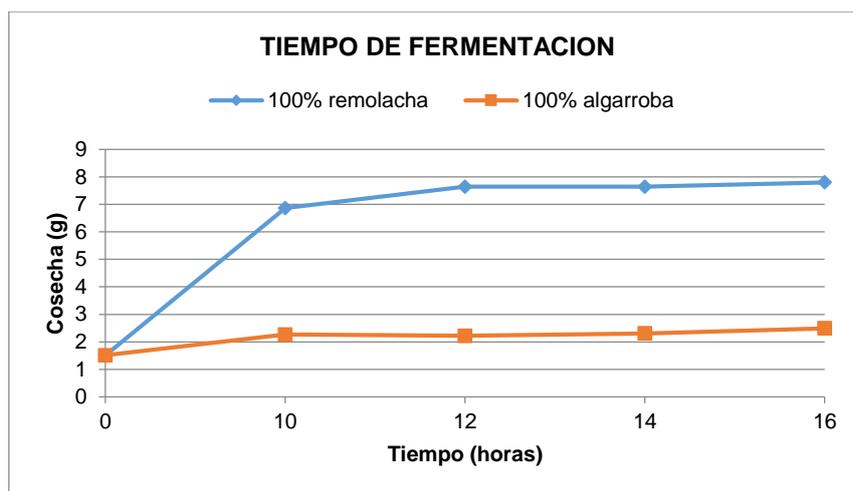


Figura 2. Gramos de cosecha de L_{32} a medida que avanza el tiempo de fermentación en un medio con melaza de remolacha (A1) y en otro con melaza de algarroba (A2)

Como se observa en la figura 2, a partir de la hora 12 se obtuvo una medida estable de los gramos de levadura producidos con melaza de remolacha, por lo que se dedujo que la fermentación había terminado. En el medio con melaza de algarroba no se observaron grandes variaciones en la cosecha obtenida entre las horas 10 y 16, hubo un ligero aumento desde un valor de 2,27 hasta 2,49 gramos de cosecha.

Hay que destacar que a lo largo del estudio los distintos ensayos se sacaron después de 16 horas de incubación, pese a haber terminado la fermentación a las 12 horas. De este modo se asegura un consumo total de todos los azúcares presentes. Además se escogió ese tiempo por cuestiones operativas y turnos en el laboratorio.

En las tablas que figuran como Anexo 1 se muestran globalmente los resultados de estos ensayos.

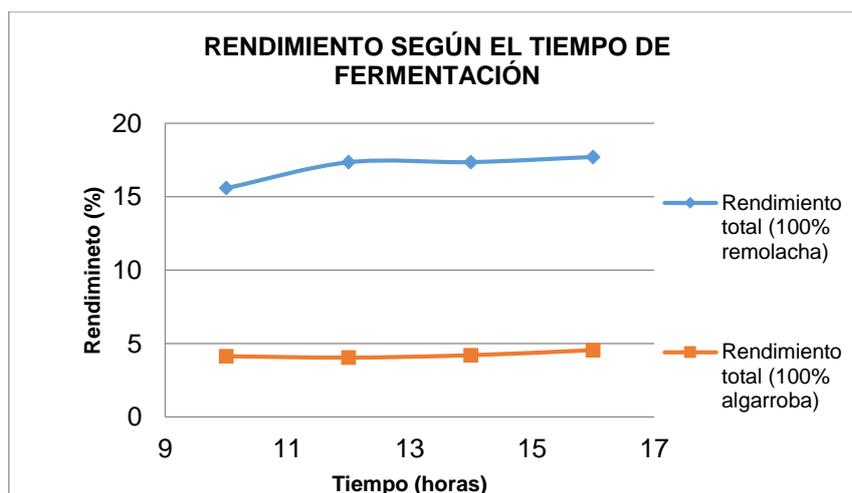


Figura 3. Variación del rendimiento total de la levadura en función del tiempo de fermentación en un medio con melaza de remolacha (A1) y en otro con melaza de algarroba (A2)

En la figura 3 se muestra el rendimiento total de la levadura a medida que avanza la fermentación.

Con melaza de remolacha como fuente de carbono, hubo un aumento en el rendimiento hasta la hora 12, que se estabilizó en un valor de 17%.

Con la melaza de algarroba el rendimiento total se mantuvo constante en torno a un valor de 4-4,5%.

Además, gracias a la variación de la cosecha obtenida con el tiempo, el crecimiento se puede ajustar a un modelo matemático. Sabiendo el momento de finalización de la fermentación (hora 12), se puede obtener la velocidad específica de crecimiento μ (1/h):

$$\mu = (X/X_0)^{1/t} \quad \text{Ec. 6}$$

Tabla 5. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento en un medio con melaza de remolacha (A1) y en otro con melaza de algarroba (A2)

| VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO | | | |
|-------------------------------------|--|---------------------|---------------------|
| | | MELAZA DE REMOLACHA | MELAZA DE ALGARROBA |
| μ | Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) | 1,14 | 1,03 |
| t | Tiempo (horas) | 12 | 12 |
| X | Población final (g) | 7,64 | 2,22 |
| X ₀ | Población inicial (g) | 1,51 | 1,51 |

De este modo, como se observa en la figura 4, se puede realizar un modelo de crecimiento que se ajusta a la ecuación mencionada en el punto 3.6. *Modelo de crecimiento* (Peña y Arango, 2008):

$$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Ec. 2}$$

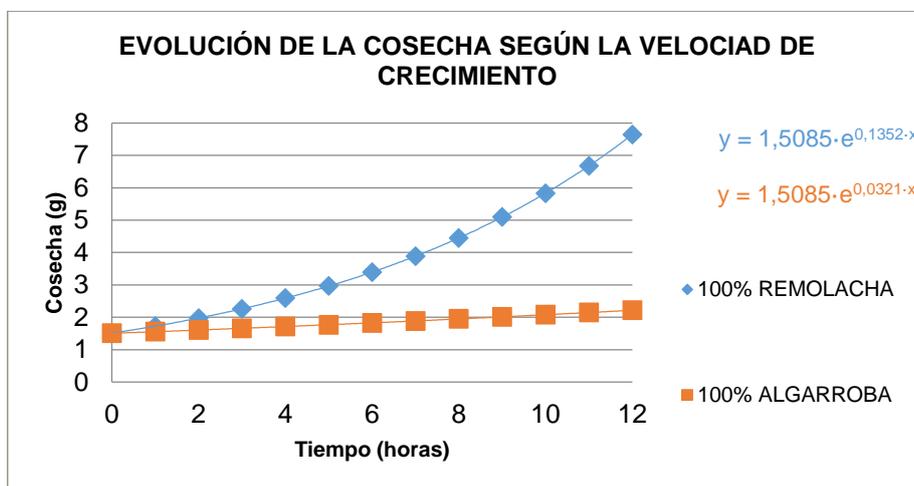


Figura 4. Evolución del crecimiento teórico empleando el modelo de crecimiento (Peña y Arango, 2008) con una velocidad específica de crecimiento de $1,14 \text{ h}^{-1}$ en un medio con melaza de remolacha (A1) y de $1,03 \text{ h}^{-1}$ en un medio con melaza de algarroba (A2).

5.4.1. Establecimiento de las condiciones/punto de referencia

Una vez definidas la siembra (1,50 g de levadura L_{32}) y el tiempo de incubación (16 horas), se realizó un ensayo para obtener la cosecha y rendimiento en unas determinadas condiciones, que se establecieron como referencia para el resto de experimentos:

Ensayo 1 (E1): medio de cultivo estándar (ver punto 5.3. *Procedimiento experimental*) con melaza de remolacha.

Además, para ver el efecto que tienen los nutrientes habitualmente incorporados por el Grupo Lesaffre (fosfato diamónico y sulfato amónico) en fermentaciones a pequeña escala, se realizaron los siguientes ensayos:

Ensayo 9 (E9): medio de cultivo con melaza de remolacha, sin añadir sulfato amónico ni fosfato diamónico.

Ensayo 10 (E10): medio de cultivo con melaza de algarroba, sin añadir sulfato amónico ni fosfato diamónico.

5.4.2. Estudio del efecto de la incorporación de biotina al medio de cultivo

Se estudió el efecto de la adición de biotina (0.02 g por cada 350 g de medio de cultivo, esta cantidad añadida estaba en exceso) sobre la cosecha y rendimiento de los siguientes ensayos:

Ensayo 2 (E2): medio de cultivo estándar con melaza de remolacha. La finalidad de este ensayo fue comparar la cosecha y rendimiento obtenidos respecto a los obtenidos en el ensayo E1. Comprobándose de esta manera si la biotina tiene un efecto significativo sobre estos parámetros.

Ensayo 8 (E8): medio de cultivo con 20% melaza de remolacha y 80% melaza de algarroba. La finalidad de este ensayo fue comprobar si hay un efecto positivo sobre la cosecha y rendimiento, de manera que se consigan igualar estos parámetros con los resultados de utilizar una proporción de 100% melaza de remolacha (ensayo E2). Se empleó esta proporción porque se comprobó con la batería de ensayos del punto 5.4.3. (*Determinación de la cosecha y rendimiento empleando distintas proporciones de melaza de remolacha y de algarroba*) que la proporción 20-80% (ensayo E6) fue la máxima concentración de algarroba que permite obtener una cosecha lo más cercana a un 100% melaza de remolacha.

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo empleados en los ensayos E2 y E8

| ENSAYO | REMOLACHA (%) | ALGARROBA (%) | BIOTINA |
|--------|---------------|---------------|---------|
| E2 | 100 | 0 | + |
| E8 | 20 | 80 | + |

5.4.3. Determinación de la cosecha y rendimiento empleando distintas proporciones de melaza de remolacha y de algarroba.

En estos ensayos se estudió la influencia que tiene la melaza de algarroba sobre la cosecha y el rendimiento de la levadura. Se emplearon distintas cantidades crecientes de melaza de algarroba empleando como base el medio de cultivo estándar:

Tabla 7. Composición de los medios de cultivo de los ensayos E3-E7

| ENSAYO | REMOLACHA (%) | ALGARROBA (%) | BIOTINA | N | P |
|--------|---------------|---------------|---------|---|---|
| E3 | 80 | 20 | - | + | + |
| E4 | 60 | 40 | - | + | + |
| E5 | 40 | 60 | - | + | + |
| E6 | 20 | 80 | - | + | + |
| E7 | 0 | 100 | - | + | + |

5.4.4. Determinación de la cosecha y rendimiento enriqueciendo el medio de algarroba con distintos nutrientes.

En estos ensayos se empleó el medio de cultivo estándar con melaza de algarroba (100% melaza de algarroba es la proporción que resultó ser más limitante, de entre todas las estudiadas en los ensayos E3-E7, para permitir el desarrollo de la levadura) y se añadieron distintos nutrientes. Estos nutrientes se eligieron considerando el agar Czapek-Dox, medio utilizado para el cultivo de levaduras y mohos. Este medio de cultivo incorpora nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio, hierro y azufre como principales nutrientes.

En estos ensayos se incorporó de manera adicional al medio de cultivo estándar: biotina, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

También se añadió extracto de levadura, el cual es un medio complejo que aporta oligoelementos y consigue así compensar la falta de ciertos micronutrientes.

Tabla 8. Composición de los medios de cultivo de los ensayos E11-E15

| ENSAYO | REMOLACHA (%) | ALGARROBA (%) | BIOTINA | K | Mg | Fe | EXTRACTO DE LEVADURA |
|--------|---------------|---------------|---------|---|----|----|----------------------|
| E11 | 0 | 100 | + | + | + | + | + |
| E12 | 0 | 100 | + | - | + | + | + |
| E13 | 0 | 100 | + | + | - | + | + |
| E14 | 0 | 100 | + | + | + | - | + |
| E15 | 0 | 100 | + | + | + | + | - |

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Establecimiento de las condiciones/punto de referencia

Tabla 9. Resultados tras la fermentación del medio de cultivo estándar (E1), de un medio de cultivo con melaza de remolacha sin sulfato amónico ni fosfato diamónico (E9) y de ese mismo medio de cultivo con melaza de algarroba (E10)

| ENSAYO | COSECHA L_{32} (g) | MELAZA 50% (g) | RENDIMIENTO TOTAL (%) | SIEMBRA L_{32} | RENDIMIENTO DE FERMENTACION (%) |
|--------|-----------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------------|
| E1 | 7,30 | 44,05 | 16,58 | 1,50 | 13,17 |
| E9 | 5,78 | 44,05 | 13,13 | 1,50 | 9,72 |
| E10 | 3,46 | 54,69 | 6,32 | 1,51 | 3,56 |

En el medio cuya única fuente de carbono era la melaza de remolacha (E1), se obtuvo una cosecha de 7,30 gramos, con un rendimiento del 16,58%. Este rendimiento es comparable al 17,35% obtenido a las 12 horas en las pruebas previas, al determinar la duración de la fermentación (punto 5.4. *Diseño experimental*).

En el caso del medio de cultivo con melaza de remolacha y ausencia de fosfato diamónico y sulfato amónico (E9), se obtuvo una cosecha de 5,78 gramos y un rendimiento 13,13%. Estos valores son inferiores a los obtenidos en el ensayo E1. La cosecha obtenida es menor al no disponer la levadura de suficiente nitrógeno y fósforo, ambos necesarios para la síntesis de proteínas y el aumento de la biomasa.

En el ensayo E10, al emplear como sustrato la melaza de algarroba y no añadir sulfato amónico y fosfato diamónico, se obtuvo una cosecha y rendimiento aún más bajos que en el ensayo E9 (3,46 g de cosecha y 6,32% de rendimiento).

Además, el ensayo E10 se puede comparar con el ensayo E7 (incluido en el punto 6.3. *Cosecha y rendimiento en función de distintas proporciones de melaza de remolacha y de algarroba*) en el que sí se añadió fosfato diamónico y sulfato amónico. Al no haber nitrógeno ni fósforo disponibles en el medio de cultivo del ensayo E10, cabe esperar que la cosecha sea inferior a la obtenida en el ensayo E7 (como es el caso de los ensayos E1 y E9). No obstante, se obtuvo como resultado una cosecha de 3,46 g, superior a los 2,5 g obtenidos en el ensayo E7.

En las tablas que figuran como Anexo 1 se muestran globalmente los resultados de estos ensayos.

6.2. Efecto de la incorporación de biotina al medio de cultivo

Tabla 10. Resultados de la incorporación de biotina al medio de cultivo estándar con melaza de remolacha (E2) y con una proporción de melaza de remolacha y algarroba de 20-80% respectivamente (E8)

| ENSAYO | COSECHA L ₃₂ (g) | MELAZA 50% (g) | RENDIMIENTO TOTAL (%) | SIEMBRA L ₃₂ (g) | RENDIMIENTO DE FERMENTACION (%) |
|--------|-----------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| E2 | 7,65 | 44,05 | 17,37 | 1,51 | 13,95 |
| E8 | 7,15 | 52,56 | 13,60 | 1,51 | 10,74 |

Al añadir biotina al medio de cultivo estándar con melaza de remolacha (E2) se obtuvo una cosecha de 7,65 g y un rendimiento del 17,37%. Si se comparan estos datos con los obtenidos en el ensayo E1 (7,30 g y 16,58%), se concluye que la adición de biotina

al medio de cultivo no tiene un efecto significativo en el aumento de la cosecha y el rendimiento de la levadura.

Al añadir biotina al medio de cultivo estándar con una proporción 20-80% de melaza de remolacha y algarroba (E8), se obtuvo una cosecha de 7,15 g y un rendimiento del 13,60%. Estos resultados comparados con los del ensayo E6 (medio estándar con a misma proporción de melazas pero sin biotina, se obtuvieron 7,06 g de cosecha y un rendimiento del 13,43%) y con los del ensayo E2, evidencian de nuevo que la biotina no tiene un efecto significativo sobre la cosecha y rendimiento de la levadura.

En las tablas que figuran como Anexo 1 se muestran globalmente los resultados de estos ensayos.

6.3. Cosecha y rendimiento en función de distintas proporciones de melaza de remolacha y de algarroba

Tabla 11. Resultados tras la fermentación del medio de cultivo estándar con cantidades crecientes de melaza de algarroba. Las cantidades van desde el ensayo E1, sin melaza de algarroba, hasta el ensayo E7 con un 100% de melaza de algarroba, aumentando un 20% en cada ensayo.

| ENSAYO | COSECHA L ₃₂ (g) | MELAZA 50% (g) | RENDIMIENTO TOTAL (%) | SIEMBRA L ₃₂ (g) | RENDIMIENTO DE FERMENTACION (%) |
|--------|-----------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| E1 | 7,30 | 44,05 | 16,58 | 1,50 | 13,17 |
| E3 | 7,33 | 46,18 | 15,88 | 1,50 | 12,62 |
| E4 | 7,95 | 48,30 | 16,46 | 1,51 | 13,33 |
| E5 | 7,77 | 50,43 | 15,41 | 1,51 | 12,42 |
| E6 | 7,06 | 52,56 | 13,43 | 1,51 | 10,55 |
| E7 | 2,50 | 54,69 | 4,58 | 1,50 | 1,82 |

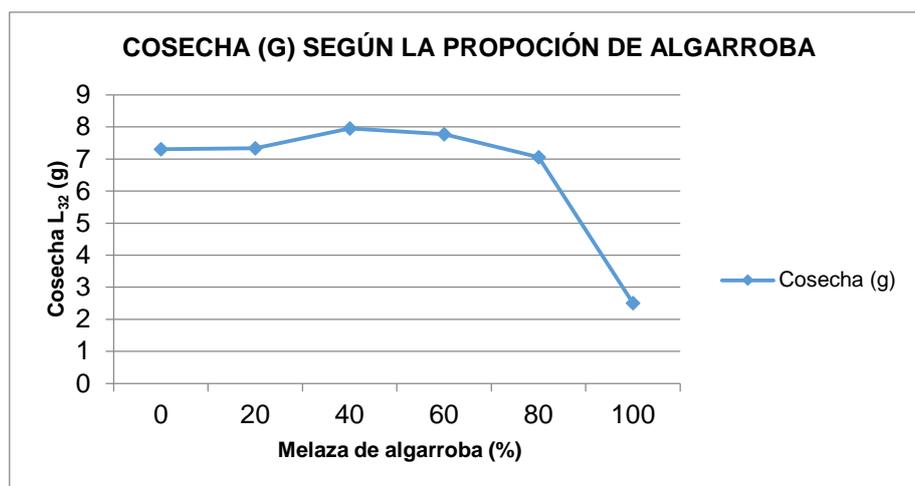


Figura 5. Evolución de los gramos de cosecha obtenidos a medida que aumenta la cantidad de melaza de algarroba en el medio.

En un principio podría considerarse el efecto positivo de la melaza de algarroba en cuanto a la cosecha obtenida: a partir de un 20% se obtuvo una cosecha mayor que la resultante de un medio sólo con melaza de remolacha. Este incremento se debe a que hay más azúcares en el medio de cultivo (la melaza de algarroba tiene más azúcares totales que la de remolacha) y además aún hay nutrientes presentes procedentes de la melaza de remolacha.

A partir de un 60% de melaza de algarroba, la cosecha disminuyó considerablemente: la concentración de azúcares en el medio sigue aumentando pero la cantidad de nutrientes procedentes de la melaza de remolacha disminuye, factor que afecta de manera negativa al crecimiento.

Tal y como se aprecia en la figura 6, un aumento de la proporción de melaza de algarroba también tuvo efecto sobre el rendimiento. Éste se mantuvo constante (en torno a un valor del 16%) hasta un 60% de algarroba, a partir de ese momento disminuyó hasta un mínimo de 4,58% al haber en el medio un 100% de melaza de algarroba.

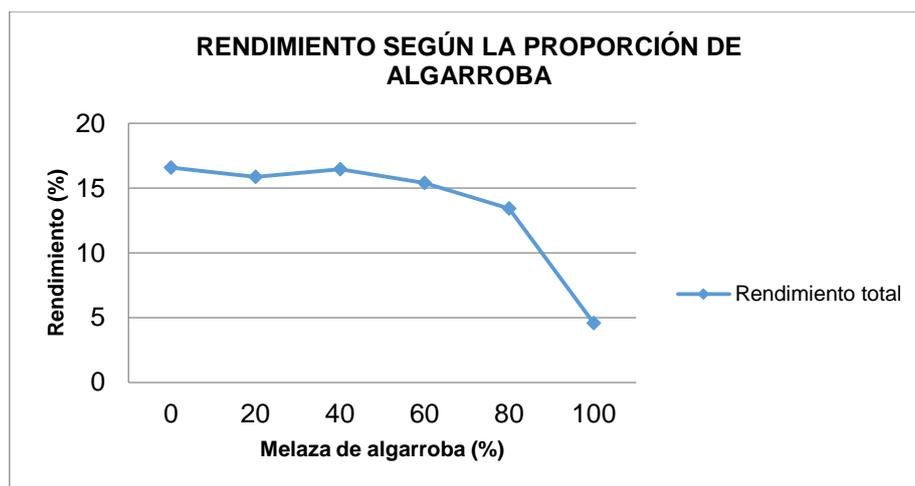


Figura 6. Evolución del rendimiento total de la levadura a medida que aumenta la cantidad de melaza de algarroba en el medio.

En las tablas que figuran como Anexo 1 se muestran globalmente los resultados de estos ensayos.

6.4. Cosecha y rendimiento enriqueciendo el medio de algarroba con distintos nutrientes .

Tabla 12. Resultados tras la fermentación del medio de cultivo estándar con melaza de algarroba y biotina y adicionando KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2 Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ y extracto de levadura (E11), y eliminando sucesivamente cada uno de esos nutrientes (E12-E15).

| ENSAYO | COSECHA L ₃₂ (g) | MELAZA 50% (g) | RENDIMIENTO TOTAL (%) | SIEMBRA L ₃₂ (g) | RENDIMIENTO DE FERMENTACION (%) |
|--------|-----------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| E11 | 7,58 | 54,69 | 13,86 | 1,52 | 11,09 |
| E12 | 7,88 | 54,69 | 14,41 | 1,51 | 11,65 |
| E13 | 3,19 | 54,69 | 5,83 | 1,51 | 3,07 |
| E14 | 7,04 | 54,69 | 12,87 | 1,50 | 10,12 |
| E15 | 5,42 | 54,69 | 9,91 | 1,51 | 7,14 |

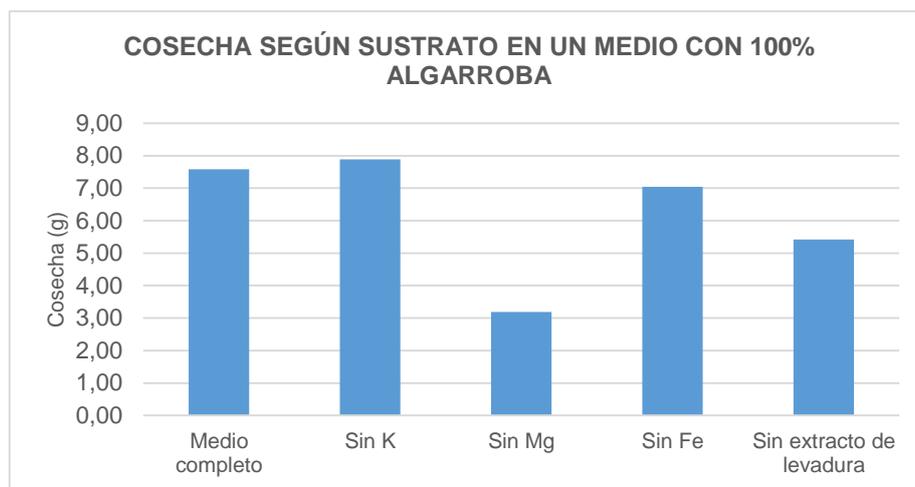


Figura 7. Cosecha obtenida con el medio de cultivo estándar con melaza de algarroba y biotina y adicionando KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y extracto de levadura (E11, medio completo), y eliminando sucesivamente cada uno de esos nutrientes (E12-E15).

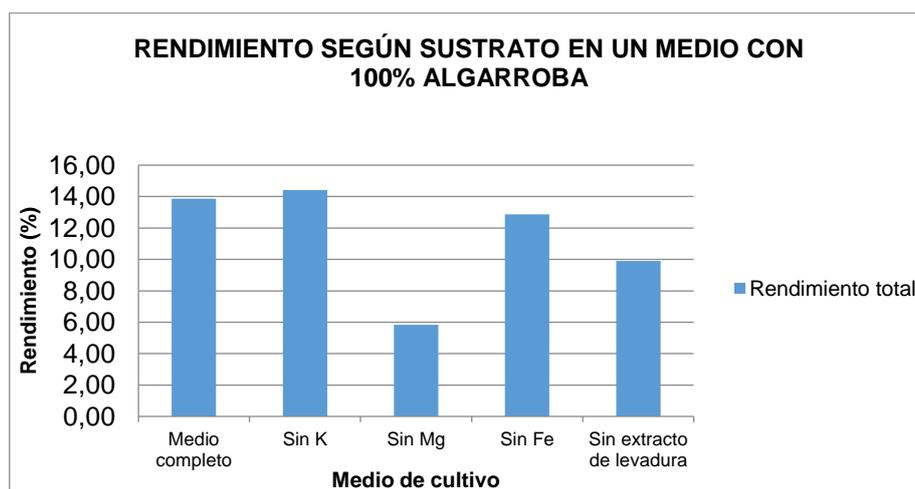


Figura 8. Rendimiento total de la levadura obtenido con el medio de cultivo estándar con melaza de algarroba y biotina y adicionando KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y extracto de levadura (E11, medio completo), y eliminando sucesivamente cada uno de esos nutrientes (E12-E15).

Como se observa en las figuras 7 y 8, los valores más altos de cosecha y rendimiento se obtuvieron al incubar la levadura en un medio de cultivo completo (E11, medio de cultivo estándar con 100% melaza de algarroba, biotina, potasio, magnesio, hierro y extracto de levadura).

El hecho de eliminar el potasio del medio de cultivo (E12) no tuvo consecuencia alguna sobre el desarrollo de la fermentación. De hecho, se puede observar que la cosecha (7,88 g) fue ligeramente superior al resultado obtenido con el medio de cultivo completo (7,58 g). Esto se debe a la influencia que tienen las condiciones experimentales sobre la variabilidad de los resultados.

La cosecha obtenida al eliminar el hierro del medio de cultivo (7,04 g obtenidos en el ensayo E14) se acerca al valor de la cosecha obtenida con el medio completo (7,58 g). Por lo tanto, al eliminar el hierro del medio no se influye de manera significativa en el desarrollo de la fermentación.

Por otro lado, sí que se aprecia una disminución de la cosecha obtenida al eliminar del medio de cultivo el magnesio (E13) y extracto de levadura (E15). Se obtuvo una cosecha de 3,19 g en el medio sin magnesio frente a los 7,58 g obtenidos en el medio de cultivo completo. Al eliminar el extracto de levadura se obtuvieron 5,42 g frente a los 7,58 g obtenidos con el medio completo.

Esta variación de la cosecha obtenida en los distintos ensayos también se percibe en el rendimiento de la levadura. Destaca el valor de 5,83% obtenido en el medio sin magnesio frente al 13,86% conseguido con el medio de cultivo completo. También hubo una disminución en el rendimiento al eliminar el extracto de levadura (9,91%).

En las tablas que figuran como Anexo 1 se muestran globalmente los resultados de estos ensayos.

7. CONCLUSIONES

- Al llevar a cabo una fermentación con melaza de remolacha en las condiciones establecidas, se obtienen valores de cosecha y rendimiento 7,30 g y 16,60% (E1).

- Se ha comprobado que la cosecha obtenida en una fermentación con melaza de algarroba suplementada con nitrógeno y fósforo (ensayo E7) es inferior a la obtenida únicamente con melaza de algarroba (E10). Esta melaza por sí sola no cuenta con una cantidad suficiente de nitrógeno y fósforo, necesarios para el aumento de la biomasa. Por tanto, el hecho de obtener una cosecha superior sin suplementación es un factor de la melaza de algarroba que podría ser objeto de un estudio posterior.

- Se ha conseguido obtener una cosecha similar y un rendimiento equiparable a los obtenidos con melaza de remolacha, empleando hasta un máximo de 60% de melaza de algarroba, obteniendo valores de cosecha y rendimiento de 7,80 g y 15,40% (E5).

- Se ha logrado llevar a cabo una fermentación empleando únicamente melaza de algarroba, obteniendo valores de cosecha y rendimiento de 2,5 g y 4,50% (E7). Estos valores son significativamente inferiores a los obtenidos con melaza de remolacha, por lo que no sería de interés industrial emplear como único sustrato melaza de algarroba.

- El hecho de incorporar nutrientes adicionales al medio de cultivo con melaza de algarroba (E11) no tiene un efecto significativo sobre la cosecha. No obstante, se ha comprobado que al eliminar el magnesio de esa suplementación, la cosecha y el rendimiento de fermentación disminuyen hasta valores de 3,10 g y 5,80%. También se ha comprobado que al eliminar el extracto de levadura de esa suplementación, la cosecha y el rendimiento de fermentación disminuyen hasta valores de 5,40 g y 9,91%.

Por tanto, la melaza de algarroba se puede emplear como sustrato en la producción de levadura de panadería, siempre y cuando se complemente con melaza de remolacha y se suplemente con nitrógeno y fósforo.

8. BIBLIOGRAFIA

Calaveras, J. (2004). *Nuevo tratado de panificación y bollería*. Madrid: Mundi-prensa.

Garibay, M G, Ramírez, R Q, Canales, A L M. (2004). *Biotecnología alimentaria*. 5º edición. México: Limusa.

Lee, B. H. (2000). *Fundamentos de la biotecnología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia

Miskiewicz, T. & Kasperski, A. (2000). *A fuzzy controller to control nutrient dosage in a fed-batch baker's yeast process*. *Biotechnology Letters*, 22, 1685-1691.

Papagianni, M., Boonpooh, Y., Matthey, M. & Kristiansen, B. (2007). *Substrate inhibition kinetics of Saccharomyces cerevisiae in fed-batch cultures operated at constant glucose and maltose concentration levels*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 301-309.

Peña, C., Arango, R. (2009). *Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de Saccharomyces cerevisiae a partir de melaza de caña de azúcar*. *Revista Dyna*, 76, 153-161.

Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., Matallana, E. (2015). *Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry*. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 167-175.

Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2004). *Microbiología*. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana

Smith, J. E. (2006). *Biotecnología*. Zaragoza: Acribia.

Van Hoek, P., De Hulster, A.F., Van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. (2000). *Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 517-523.

9. ANEXO 1. Resultados de los ensayos A1 y A2 y E1-E15

| Horas fermentación | REMOLACHA (%) | ALGARROBA (%) | BIOTINA | N | P | Antiespumante | g/Kg | COSECHA HA (g) | MELAZA 50% (g) | RENDIMIENTO TOTAL % | SIEMBRA L 32 | RENDIMIENTO DE FERMENTACIÓN % |
|--------------------|---------------|---------------|---------|---|---|---------------|-------|----------------|----------------|---------------------|--------------|-------------------------------|
| 0 | | | | | | | | 1,51 | | | | |
| 16 | 100 | 0 | - | + | + | + | 23,86 | 7,80 | 44,05 | 17,71 | 1,51 | 14,29 |
| 14 | 100 | 0 | - | + | + | + | 23,38 | 7,65 | 44,05 | 17,36 | 1,50 | 13,95 |
| 12 | 100 | 0 | - | + | + | + | 23,32 | 7,64 | 44,05 | 17,35 | 1,51 | 13,93 |
| 10 | 100 | 0 | - | + | + | + | 20,87 | 6,87 | 44,05 | 15,59 | 1,51 | 12,15 |
| 16 | 0 | 100 | - | + | + | + | 7,44 | 2,49 | 54,69 | 4,56 | 1,51 | 1,80 |
| 14 | 0 | 100 | - | + | + | + | 6,91 | 2,31 | 54,69 | 4,22 | 1,50 | 1,47 |
| 12 | 0 | 100 | - | + | + | + | 6,62 | 2,22 | 54,69 | 4,06 | 1,50 | 1,31 |
| 10 | 0 | 100 | - | + | + | + | 6,75 | 2,27 | 54,69 | 4,15 | 1,51 | 1,38 |

| ENSAYO | REMOLACHA (%) | ALGARROBA (%) | BIOTINA | N | P | Antiespumante | K | Mg | Fe | EXTRACTO DE LEVADURA | g/Kg | COSECHA (g) | MELAZA 50% (g) | RENDIMIENTO TOTAL % | SIEMBRA L 32 (g) | RENDIMIENTO DE FERMENTACIÓN % | ENSAYO |
|-------------|---------------|---------------|---------|---|---|---------------|---|----|----|----------------------|-------|-------------|----------------|---------------------|------------------|-------------------------------|-------------|
| E1 (blanco) | 100 | 0 | - | + | + | + | - | - | - | - | 21,98 | 7,30 | 44,05 | 16,58 | 1,50 | 13,17 | E1 (blanco) |
| E2 | 100 | 0 | + | + | + | + | - | - | - | - | 23,28 | 7,65 | 44,05 | 17,37 | 1,51 | 13,95 | E2 |
| E3 | 80 | 20 | - | + | + | + | - | - | - | - | 22,36 | 7,33 | 46,18 | 15,88 | 1,50 | 12,62 | E3 |
| E4 | 60 | 40 | - | + | + | + | - | - | - | - | 24,35 | 7,95 | 48,30 | 16,46 | 1,51 | 13,33 | E4 |
| E5 | 40 | 60 | - | + | + | + | - | - | - | - | 23,83 | 7,77 | 50,43 | 15,41 | 1,51 | 12,42 | E5 |
| E6 | 20 | 80 | - | + | + | + | - | - | - | - | 21,65 | 7,06 | 52,56 | 13,43 | 1,51 | 10,55 | E6 |
| E7 | 0 | 100 | - | + | + | + | - | - | - | - | 7,54 | 2,50 | 54,69 | 4,58 | 1,50 | 1,82 | E7 |
| E8 | 20 | 80 | + | + | + | + | - | - | - | - | 21,87 | 7,15 | 52,56 | 13,60 | 1,51 | 10,74 | E8 |
| E9 | 100 | 0 | - | - | + | + | - | - | - | - | 17,55 | 5,78 | 44,05 | 13,13 | 1,50 | 9,72 | E9 |
| E10 | 0 | 100 | - | - | + | + | - | - | - | - | 10,55 | 3,46 | 54,69 | 6,32 | 1,51 | 3,56 | E10 |
| E11 | 0 | 100 | + | + | + | + | + | + | + | + | 23,27 | 7,58 | 54,69 | 13,86 | 1,52 | 11,09 | E11 |
| E12 | 0 | 100 | + | + | + | + | - | + | + | + | 23,27 | 7,88 | 54,69 | 14,41 | 1,51 | 11,65 | E12 |
| E13 | 0 | 100 | + | + | + | + | + | + | + | + | 9,71 | 3,19 | 54,69 | 5,83 | 1,51 | 3,07 | E13 |
| E14 | 0 | 100 | + | + | + | + | + | + | + | + | 21,62 | 7,04 | 54,69 | 12,87 | 1,50 | 10,12 | E14 |
| E15 | 0 | 100 | + | + | + | + | + | + | + | + | 16,60 | 5,42 | 54,69 | 9,91 | 1,51 | 7,14 | E15 |