

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN
MICROBIOLÓGICA DE LA RIBOFLAVINA (VITAMINA B₂) POR MEDIO DE
LA ACCIÓN METABÓLICA DE LA *Candida utilis***

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
ERIC MAURICIO MARTÍNEZ PALACIOS**

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

MAYO DE 2008

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ.

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ.

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO.

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ.

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

ASESORA DE ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

ASESORA DE ÁREA DE ALIMENTOS

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos.

DOCENTE DIRECTOR

MSc. María del Carmen Guillén de Medrano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre celestial por haberme dado los medios materiales e intelectuales para la realización del presente trabajo. También extendo mi agradecimiento y reconocimiento mi madre Esther Leonor Palacios y a mi Padre Rafael Mauricio Martínez por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de mi formación profesional.

Agradezco a mi docente directora: MSc. María del Carmen Guillén de Medrano y al Comité de Trabajos de Graduación: Lic. Odette Rauda, MSc. Coralía de Díaz y MSc. Evelyn de Ramos, por la orientación profesional brindada a lo largo de las evaluaciones. Así mismo agradezco a: Sr. Oscar Coreas, Lic. Julio Valle y Lic. Arturo Manzini por su oportuna y valiosa colaboración.

INDICE

	Pag.
Resumen	
Capitulo I.	
1.0 Introducción.	xliv
Capitulo II	
2.0 Objetivos	47
2.1 Objetivo general	47
2.2 Objetivos específicos	47
Capitulo III	
3.0 Marco teórico.	49
3.1 Consecuencias de la desnutrición	49
3.2 Datos recientes	50
3.3 Vitaminas y nutrición	51
3.4 Riboflavina	52
3.4.1 Generalidades	52
3.4.2 Estructura química	52
3.4.3 Características y propiedades físico-químicas	53
3.4.4 Fuentes	54

3.4.5	Métodos de producción	54
3.4.6	Funciones fisiológicas	55
3.4.7	Acción bioquímica	55
3.4.8	Metabolismo	57
3.4.9	Deficiencia	58
3.4.10	Requerimientos diarios	59
3.4.11	Cuadro clínico de personas con arriboflavinosis	60
3.4.12	Pruebas de laboratorio	61
3.4.13	Tratamiento	61
3.4.14	Toxicidad	61
3.4.15	Identificación	62
3.4.16	Determinación de riboflavina	62
3.4.16.1	Medición Fotométrica del color amarillo de la riboflavina	62
3.4.16.2	Método de la lumiflavina	63
3.4.16.3	Determinación espectrofotométrica usando sulfato mercúrico (reactivo de Denige) o nitrato de plata	65
3.5	Levaduras	66
3.5.1	Generalidades	66
3.5.2	Descripción de una célula de levadura	68
3.5.3	Historia de las levaduras	69
3.5.4	Productos alimenticios de las levaduras	71

3.5.5	Identificación de levaduras	73
3.6	Candida utilis	77
3.6.1	Generalidades	77
3.6.2	Clasificación	78
3.6.3	Sinónimos	78
3.6.4	Usos	79
3.7	Utilización de residuos agroindustriales como sustrato para microorganismos	80
3.8	La planta de piña	81
3.8.1	Generalidades	81
3.8.2	Características de cultivo	82
3.8.3	Frutos	82
3.8.4	Usos e importancia	83
3.8.5	Variedades	84
3.8.6	Madurez fisiológica	84
3.8.7	Cambios composicionales durante el desarrollo	85
3.9	Cinética de crecimiento microbiano	86
3.9.1	Medición del crecimiento microbiano	88
3.9.2	Cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes	91
3.9.3	Evaluación de la cinética de crecimiento microbiano	93
3.9.3.1	Crecimiento de microorganismos	94
3.9.3.2	Consumo de nutrientes	94

3.9.3.3	Formación de productos	95
3.9.3.4	Rendimiento en el cultivo	96
3.10	Idealización y modelado matemático de sistemas naturales	97
3.10.1	Herramientas del modelado.	98
3.10.2	Consideraciones al modelar un sistema.	101
Capitulo IV		
4.0	Diseño metodológico.	104
4.1	Tipo de estudio.	104
4.2	Investigación bibliográfica.	104
4.3	Investigación de campo.	104
4.4	Parte experimental.	105
4.4.1	Obtención del jugo de cáscara de piña.	105
4.4.2	Preparación del biorreactor.	106
4.4.3	Preparación de la fuente de oxígeno.	106
4.4.4	Preparación del medio de producción.	107
4.4.5	Preparación del inóculo.	107
4.4.6	Técnica de producción.	108
4.4.7	Determinación de biomasa.	109
4.4.8	Determinación de azúcares totales.	110
4.4.9	Determinación de pH.	112
4.4.10	Identificación de la riboflavina.	112

4.4.11 Determinación espectrofotométrica de riboflavina.	113
Capítulo V.	
5.0 Resultados e interpretación de resultados.	116
5.1 Resultados a partir de datos experimentales.	116
5.1.1 Ensayo 1 (sin aditivos).	116
5.1.1.1 Determinación de biomasa.	116
5.1.1.2 Rapidez específica de crecimiento.	119
5.1.1.3 Consumo de sustrato.	121
5.1.1.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	123
5.1.1.5 Rapidez específica de consumo de sustrato.	125
5.1.1.6 Formación de producto.	127
5.1.1.7 Rapidez volumétrica de formación de producto.	129
5.1.1.8 Rapidez específica de formación de producto.	131
5.1.1.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa. sobre sustrato.	133
5.1.1.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	135
5.1.1.11 Determinación de pH.	137
5.1.2 Ensayo 2 (Sacarosa como aditivo).	139
5.1.2.1 Determinación de biomasa.	139

5.1.2.2	Rapidez específica de crecimiento.	142
5.1.2.3	Consumo de sustrato.	144
5.1.2.4	Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	146
5.1.2.5	Rapidez específica de consumo de sustrato.	148
5.1.2.6	Formación de producto.	150
5.1.2.7	Rapidez volumétrica de formación de producto.	152
5.1.2.8	Rapidez específica de formación de producto.	154
5.1.2.9	Coeficiente de rendimiento de biomasa. sobre sustrato.	156
5.1.2.10	Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	158
5.1.2.11	Determinación de pH.	160
5.1.3	Ensayo 3 (Sacarosa y sales inorgánicas como aditivos).	161
5.1.3.1	Determinación de biomasa.	161
5.1.3.2	Rapidez específica de crecimiento.	164
5.1.3.3	Consumo de sustrato.	166
5.1.3.4	Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	168
5.1.3.5	Rapidez específica de consumo de sustrato.	170
5.1.3.6	Formación de producto.	172
5.1.3.7	Rapidez volumétrica de formación de producto.	174
5.1.3.8	Rapidez específica de formación de producto.	176

5.1.3.9	Coeficiente de rendimiento de biomasa. sobre sustrato.	178
5.1.3.10	Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	180
5.1.3.11	Determinación de pH.	182
5.2	Comparación de los resultados obtenidos a partir de datos experimentales de 3 ensayos.	184
5.2.1	Determinación de biomasa.	184
5.2.2	Rapidez específica de crecimiento.	186
5.2.3	Consumo de sustrato.	188
5.2.4	Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	190
5.2.5	Rapidez específica de consumo de sustrato.	192
5.2.6	Formación de producto.	193
5.2.7	Rapidez volumétrica de formación de producto.	196
5.2.8	Rapidez específica de formación de producto.	197
5.2.9	Coeficiente de rendimiento de biomasa. sobre sustrato.	199
5.2.10	Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	200
5.2.11	Determinación de pH.	202

5.3 Idealización del comportamiento de la cinetica de crecimiento y producción de riboflavina durante el proceso fermentativo.	203
5.3.1 Idealización del ensayo 1 (sin aditivos).	205
5.3.1.1 Determinación de biomasa.	205
5.3.1.2 Rapidez especifica de crecimiento.	208
5.3.1.3 Consumo de sustrato.	211
5.3.1.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	214
5.3.1.5 Rapidez especifica de consumo de sustrato.	216
5.3.1.6 Formación de producto.	218
5.3.1.7 Rapidez volumétrica de formación de producto.	221
5.3.1.8 Rapidez especifica de formación de producto.	223
5.3.1.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato.	225
5.3.1.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	229
5.3.2 Idealización de ensayo 2 (Sacarosa como aditivo).	233
5.3.2.1 Determinación de biomasa.	233
5.3.2.2 Rapidez especifica de crecimiento.	236
5.3.2.3 Consumo de sustrato.	239
5.3.2.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	242

5.3.2.5	Rapidez específica de consumo de sustrato.	244
5.3.2.6	Formación de producto.	246
5.3.2.7	Rapidez volumétrica de formación de producto.	249
5.3.2.8	Rapidez específica de formación de producto.	251
5.3.2.9	Coeficiente de rendimiento de biomasa. sobre sustrato.	253
5.3.2.10	Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	258
5.3.3	Idealización de ensayo 3 (Sacarosa y sales inorgánicas como aditivos).	262
5.3.3.1	Determinación de biomasa.	262
5.3.3.2	Rapidez específica de crecimiento.	265
5.3.3.3	Consumo de sustrato.	268
5.3.3.4	Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.	271
5.3.3.5	Rapidez específica de consumo de sustrato.	274
5.3.3.6	Formación de producto.	276
5.3.3.7	Rapidez volumétrica de formación de producto.	279
5.3.3.8	Rapidez específica de formación de producto.	281
5.3.3.9	Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato.	283

5.3.3.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato.	286
5.4 Comparación de resultados idealizados en 3 ensayos de cinética de crecimiento y producción de riboflavina.	290
Capitulo VI.	
6.0 Conclusiones.	311
Capitulo VII.	
7.0 Recomendaciones.	315
Bibliografía.	
Anexos.	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Figura N° 118: Mapa de El Salvador mostrando los departamentos de mayor incidencia de desnutrición crónica en niños menores de 5 años.
- 2 Figura N° 119: Fotografía de niños con diferentes estados de desnutrición.
- 3 Figura N° 120: Esquema del aprovechamiento de la piña.
- 4 Archivo fotográfico.
- 5 Obtención del jugo de cáscara de piña.
- 6 Figura N° 134: Preparación del medio de producción.
- 7 Figura N° 135: Preparación del inóculo.
- 8 Figura N° 136: Técnica de producción.
- 9 Figura N° 137: Determinación de biomasa por el método de peso seco.
- 10 Figura N° 138: Determinación de azúcares totales por el método de fenol – sulfúrico.
- 11 Figura N° 139: Elaboración de la curva estándar de sacarosa.
- 12 Figura N° 140: Determinación espectrofotométrica de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio.
- 13 Tabla N° 123: Resultados por triplicado de la determinación de biomasa por el método del peso seco a lo largo del ensayo 1.

- 14 Tabla N° 124: Resultados por triplicado de la determinación de biomasa por el método del peso seco a lo largo del ensayo 2.
- 15 Tabla N° 125: Resultados por triplicado de la determinación de biomasa por el método del peso seco a lo largo del ensayo 3.
- 16 Ajuste de biomasa en inóculos para obtener la misma concentración inicial de biomasa en los 3 ensayos.
- 17 Tabla N° 128: Resultados por triplicado en la elaboración de la curva estándar de sacarosa.
- 18 Curva estándar de sacarosa: absorbancia vrs concentración de sacarosa
- 19 Tabla N° 129: Resultados por triplicado de la cuantificación de azúcares totales por el método de fenol - sulfúrico a lo largo del ensayo 1.
- 20 Tabla N° 130: Resultados por triplicado de la cuantificación de azúcares totales por el método de fenol – sulfúrico a lo largo del ensayo 2.
- 21 Tabla N° 131: Resultados por triplicado de la cuantificación de azúcares totales por el método de fenol - sulfúrico a lo largo del ensayo 3.
- 22 Tabla N° 132: Resultados por triplicado de la cuantificación de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio a lo largo del ensayo 1.
- 23 Tabla N° 133: Resultados por triplicado de la cuantificación de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio a lo largo del ensayo 2.
- 24 Tabla N° 134: Resultados por triplicado de la cuantificación de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio a lo largo del ensayo 3.

- 25 Tabla N° 135: Resultados por triplicado de la medición de pH a lo largo del ensayo 1.
- 26 Tabla N° 136: Resultados por triplicado de la medición de pH a lo largo del ensayo 2.
- 27 Tabla N° 137: Resultados por triplicado de la medición de pH a lo largo del ensayo 3.
- 28 Material y equipo.
- 29 Reactivos y medios de cultivo.
- 30 Preparación de reactivos.
- 31 Preparación de agar sabouraud – dextrosa.
- 32 Tabla N° 138: importaciones acumuladas de vitamina B₂ y sus derivados.
El Salvador, Enero - Diciembre 2004.
- 33 Tabla N° 139: importaciones acumuladas de vitamina B₂ y sus derivados.
El Salvador, Enero - Octubre 2005.
- 34 Tabla N° 140: Algunos medicamentos disponibles en el mercado que contienen Riboflavina.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PAGINA
1. Estructura química de la riboflavina.	53
2. Estructura de la riboflavina, FMN y FAD.	56
3. Conversión de la riboflavina en lumiflavina.	64
4. Complejo riboflavina – mercurio.	65
5. Morfología de diversos géneros de levaduras	67
6. Morfología de las colonias de levadura.	74
7. Imágenes de células de levadura vistas a través de un microscopio a diferentes aumentos.	75
8. Imagen de la <i>Cándida utilis</i> vista a través de un microscopio electrónico.	78
9. Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes.	92
10. LnX Vrs Tiempo. Ensayo 1.	117
11. Rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 1.	120
12. Concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Ensayo 1.	122
13. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.	124

14. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo.	
Ensayo 1.	126
15. Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 1.	128
16. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo.	
Ensayo 1.	130
17. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo.	
Ensayo 1.	132
18. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.	134
19. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.	136
20. pH Vrs Tiempo. Ensayo 1.	138
21. LnX Vrs Tiempo. Ensayo 2.	140
22. Rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 2.	143
23. Concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo.	
Ensayo 2.	145
24. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo.	
Ensayo 2.	147
25. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo.	
Ensayo 2.	149
26. Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 2.	151

27. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2.	153
28. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2.	155
29. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.	157
30. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.	159
31. pH Vrs Tiempo. Ensayo 2.	160
32. LnX Vrs Tiempo. Ensayo 3.	162
33. Rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 3.	165
34. Concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Ensayo 3.	167
35. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.	169
36. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.	171
37. Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 3.	173
38. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo Ensayo 3.	175

39. Rapidez especifica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3.	177
40. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.	179
41. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.	181
42. pH Vrs Tiempo. Ensayo 3.	183
43. LnX Vrs Tiempo. 3 ensayos comparados.	185
44. Generación porcentual de biomasa para 3 ensayos.	185
45. Rapidez especifica de crecimiento Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	187
46. Concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	189
47. Consumo porcentual de sustrato para 3 ensayos.	189
48. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	191
49. Rapidez especifica de consumo de sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	192
50. Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	194
51. Porcentaje de producción de riboflavina para 3 ensayos.	195

52. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	196
53. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	198
54. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	199
55. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.	201
56. pH Vrs Tiempo. 3 ensayos comparados.	202
57. Regresión polinomial de Gráfica LnX Vrs Tiempo. Ensayo 1.	205
58. Rectas tangentes a la curva idealizada LnX Vrs tiempo. Ensayo 1.	208
59. Rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.	209
60. Regresión polinomial de Gráfica Concentración de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1.	211
61. Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.	214
62. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1 idealizado.	215

63. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.	217
64. Regresión polinomial de Gráfica Concentración de Riboflavina Vrs Tiempo. Ensayo1.	218
65. Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 1. (Cero – 45 horas)	221
66. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.	222
67. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.	224
68. Biomasa Vrs concentración de sustrato. Ensayo 1 idealizado.	226
69. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1 idealizado.	228
70. Concentración de Riboflavina Vrs concentración de sustrato. Ensayo 1 idealizado.	230
71. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1 idealizado.	232
72. Regresión polinomial de Gráfica LnX Vrs Tiempo. Ensayo 2.	233
73. Rectas tangentes a la curva idealizada LnX Vrs tiempo. Ensayo 2.	236

74. Rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.	237
75. Regresión polinomial de Gráfica Concentración de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2.	239
76. Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.	242
77. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2 idealizado.	243
78. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.	245
79. Regresión polinomial de Gráfica Concentración de Riboflavina Vrs Tiempo. Ensayo 2.	246
80. Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 2. (Cero – 30 horas)	249
81. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.	250
82. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.	252
83. Biomasa Vrs concentración de sustrato. Ensayo 2 idealizado.	254

84. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2 idealizado.	255
85. Biomasa Vrs concentración de sustrato (fase de crecimiento críptico). Ensayo 2 idealizado.	256
86. Coeficiente de rendimiento de Biomasa sobre sustrato Vrs tiempo (fase de crecimiento críptico). Ensayo 2 idealizado.	258
87. Concentración de Riboflavina Vrs concentración de sustrato. Ensayo 2 idealizado.	259
88. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2 idealizado.	261
89. Regresión polinomial de Gráfica LnX Vrs Tiempo. Ensayo 3.	262
90. Rectas tangentes a la curva idealizada LnX Vrs tiempo. Ensayo 3.	265
91. Rapidez especifica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.	266
92. Regresión polinomial de Gráfica Concentración de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3.	268
93. Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.	271

94. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3 idealizado.	272
95. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.	275
96. Regresión polinomial de Gráfica Concentración de Riboflavina Vrs Tiempo. Ensayo 3.	276
97. Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 3. (Cero – 22.5 horas).	279
98. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.	280
99. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.	282
100. Biomasa Vrs concentración de sustrato. Ensayo 3 idealizado.	284
101. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3 idealizado.	286
102. Concentración de Riboflavina Vrs concentración de sustrato. Ensayo 3 idealizado.	287
103. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3 idealizado.	289
104. Biomasa Vrs concentración de sustrato para 3 ensayos idealizados.	290

105. Generación porcentual de biomasa para 3 ensayos idealizados.	291
106. Consumo porcentual de sustrato para 3 ensayos idealizados.	292
107. Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	294
108. Rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	295
109. Rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	296
110. Concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	298
111. Rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	300
112. LnX Vrs Tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	301
113. Porcentaje de producción de riboflavina para 3 ensayos idealizados.	302
114. Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	304
115. Rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	305
116. Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.	307

117. Rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo.

Comparación de 3 ensayos idealizados.

309

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
1. Alimentos ricos en vitamina B2/riboflavina.	54
2. Composición química en 100 g de jugo.	83
3. Elaboración de la curva estándar de sacarosa.	112
4. Resultados del análisis del crecimiento microbiano por el método del peso seco. Ensayo 1.	116
5. Cálculo de generación porcentual de biomasa. Ensayo1.	117
6. Cálculo de la rapidez específica de crecimiento. Ensayo 1.	119
7. Resultados de la cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico. Ensayo 1.	121
8. Cálculo del consumo porcentual de sustrato. Ensayo 1.	122
9. Cálculo de la Rapidez volumétrica de consumo de sustrato. Ensayo 1.	123
10. Cálculo de la Rapidez específica de consumo de sustrato. Ensayo 1.	125
11. Resultados de la cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de sodio. Ensayo 1.	127
12. Cálculo del porcentaje de producción de Riboflavina. Ensayo 1.	127

13. Cálculo de la Rapidez volumétrica de formación de producto. Ensayo 1.	129
14. Cálculo de la rapidez específica de formación de producto. ensayo 1.	131
15. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato. Ensayo 1.	133
16. Cálculo del Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato. Ensayo 1.	135
17. Resultados de la medición del pH. Ensayo 1.	138
18. Resultados del análisis del crecimiento microbiano por el método del peso seco. Ensayo 2.	139
19. Cálculo de generación porcentual de biomasa. Ensayo2.	140
20. Cálculo de la rapidez específica de crecimiento. Ensayo 2.	142
21. Resultados de la cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico. Ensayo 2.	144
22. Cálculo del consumo porcentual de sustrato. Ensayo 2.	144
23. Cálculo de la Rapidez volumétrica de consumo de sustrato. Ensayo 2.	146
24. Cálculo de la Rapidez específica de consumo de sustrato. Ensayo 2.	148
25. Resultados de la cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de sodio. Ensayo 2.	150

26. Cálculo del porcentaje de producción de Riboflavina. Ensayo 2.	151
27. Cálculo de la Rapidez volumétrica de formación de producto. Ensayo 2.	152
28. Cálculo de la rapidez específica de formación de producto. ensayo 2.	154
29. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato. Ensayo 2.	156
30. Cálculo del Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato. Ensayo 2.	158
31. Resultados de la medición del pH. Ensayo 2.	160
32. Resultados del análisis del crecimiento microbiano por el método del peso seco. Ensayo 3.	161
33. Cálculo de generación porcentual de biomasa. Ensayo 3.	162
34. Cálculo de la rapidez específica de crecimiento. Ensayo 3.	164
35. Resultados de la cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico. Ensayo 3.	166
36. Cálculo del consumo porcentual de sustrato. Ensayo 3.	166
37. Cálculo de la Rapidez volumétrica de consumo de sustrato. Ensayo 3.	168
38. Cálculo de la Rapidez específica de consumo de sustrato. Ensayo 3.	170

39. Resultados de la cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de sodio. Ensayo 3.	172
40. Cálculo del porcentaje de producción de Riboflavina. Ensayo 3.	172
41. Cálculo de la Rapidez volumétrica de formación de producto. Ensayo 3.	174
42. Cálculo de la rapidez específica de formación de producto. ensayo 3.	176
43. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato. Ensayo 3.	178
44. Cálculo del Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato. Ensayo 3.	180
45. Resultados de la medición del pH. Ensayo 3.	182
46. Resultados de 3 ensayos para el análisis del crecimiento microbiano por el método del peso seco.	184
47. Concentraciones máximas y generación porcentual de biomasa obtenidos en 3 ensayos.	184
48. Resultados del cálculo de la rapidez específica de crecimiento para 3 ensayos.	186
49. Resultados de la cuantificación de azúcares totales por el método de fenol - sulfúrico para 3 ensayos.	188

50. Mínimos y consumo porcentual de sustrato obtenidos en la cuantificación de azúcares totales para 3 ensayos.	188
51. Resultados del cálculo de la rapidez volumétrica de consumo de sustrato para 3 ensayos.	190
52. Resultados del cálculo de la rapidez específica de consumo de sustrato para 3 ensayos.	198
53. Resultados de la cuantificación de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio para 3 ensayos.	193
54. concentraciones máximas y porcentajes de producción obtenidos en la cuantificación de riboflavina para 3 ensayos.	194
55. Resultados del cálculo de la rapidez volumétrica de formación de producto para 3 ensayos.	196
56. Resultados del cálculo de la rapidez específica de formación de producto para 3 ensayos.	197
57. Resultados del cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato para 3 ensayos.	199
58. Resultados del cálculo del coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato para 3 ensayos.	200
59. Resultados de la medición de pH para 3 ensayos.	202
60. Resultados de biomasa obtenidos por aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 1.	206

61. Cálculo de generación porcentual de biomasa a partir de datos idealizados. Ensayo 1.	207
62. Resultados de rapidez específica de crecimiento obtenidos a partir de la figura N° 58.	209
63. Resultados de azúcares totales obtenidos por Aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 1.	212
64. Cálculo del consumo porcentual de sustrato a partir de datos idealizados. Ensayo 1.	213
65. Resultados de Rapidez volumétrica de consumo de sustrato obtenidos a partir de la figura N° 61.	215
66. Cálculo de la rapidez específica de consumo de sustrato. Ensayo 1 idealizado.	216
67. Concentración de riboflavina obtenida por aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 1. (cero – 45 horas)	219
68. Cálculo del porcentaje de producción de riboflavina a partir de datos idealizados. Ensayo 1.	220
69. Resultados de rapidez volumétrica de formación de producto obtenidos a partir de la figura N° 65.	222
70. Cálculo de la rapidez específica de formación de producto. Ensayo 1 idealizado.	223
71. Consumo de sustrato y generación de biomasa. Ensayo 1 idealizado.	225

72. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato obtenidos a partir de resultados idealizados de ensayo 1 (tabla N° 71).	227
73. Consumo de sustrato y formación de producto. Ensayo 1 idealizado.	229
74. Cálculo del coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato obtenidos a partir de resultados idealizados de ensayo 1 (tabla N° 73).	231
75. Resultados de biomasa obtenidos por aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 2.	234
76. Cálculo de generación porcentual de biomasa a partir de datos idealizados. Ensayo 2.	235
77. Resultados de rapidez específica de crecimiento obtenidos a partir de la figura N° 73.	237
78. Resultados de azúcares totales obtenidos por Aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 2.	240
79. Cálculo del consumo porcentual de sustrato a partir de datos idealizados. Ensayo 2.	241
80. Resultados de Rapidez volumétrica de consumo de sustrato obtenidos a partir de la figura N° 82.	243
81. Cálculo de la rapidez específica de consumo de sustrato. Ensayo 2 idealizado.	244

82. Concentración de riboflavina obtenida por aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 2. (Cero – 30 horas)	247
83. Cálculo del porcentaje de producción de riboflavina a partir de datos idealizados. Ensayo 2.	248
84. Resultados de rapidez volumétrica de formación de producto obtenidos a partir de la figura N° 80.	250
85. Cálculo de la rapidez específica de formación de producto. Ensayo 2 idealizado.	251
86. Consumo de sustrato y generación de biomasa. Ensayo 2 idealizado.	253
87. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato obtenidos a partir de resultados idealizados de ensayo 2 (tabla N° 86).	255
88. Consumo de sustrato y generación de biomasa (crecimiento crítico). Ensayo 2 idealizado.	256
89. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato obtenido a partir de resultados idealizados de ensayo 2 (tabla N° 88).	257
90. Consumo de sustrato y formación de producto. Ensayo 2 idealizado.	259

91. Cálculo del coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato obtenidos a partir de resultados idealizados de ensayo 2 (tabla N° 90).	260
92. Resultados de biomasa obtenidos por aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 3.	263
93. Cálculo de generación porcentual de biomasa a partir de datos idealizados. Ensayo 3.	264
94. Resultados de rapidez específica de crecimiento obtenidos a partir de la figura N° 99.	266
95. Resultados de azúcares totales obtenidos por Aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 3.	269
96. Cálculo del consumo porcentual de sustrato a partir de datos idealizados. Ensayo 3.	270
97. Resultados de Rapidez volumétrica de consumo de sustrato obtenidos a partir de la figura N° 93.	272
98. Cálculo de la rapidez específica de consumo de sustrato. Ensayo 3 idealizado.	274
99. Concentración de riboflavina obtenida por aplicación de la ecuación de regresión polinomial. Ensayo 3. (Cero – 22.5 horas).	277
100. Cálculo del porcentaje de producción de riboflavina a partir de datos idealizados. Ensayo 3.	278

101. Resultados de rapidez volumétrica de formación de producto obtenidos a partir de la figura N° 97.	280
102. Cálculo de la rapidez específica de formación de producto. Ensayo 3 idealizado.	281
103. Consumo de sustrato y generación de biomasa. Ensayo 3 idealizado.	283
104. Cálculo del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato obtenidos a partir de resultados idealizados de ensayo 1 (tabla N° 103).	285
105. Consumo de sustrato y formación de producto. Ensayo 3 idealizado.	287
106. Cálculo del coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato obtenidos a partir de resultados idealizados de ensayo 3 (tabla N° 105).	288
107. Consumo de sustrato y generación de biomasa en 3 ensayos idealizados.	290
108. Concentraciones máximas y generación porcentual de biomasa de 3 ensayos idealizados.	291
109. Concentración mínima de sustrato y consumo porcentual de sustrato para 3 ensayos idealizados.	292
110. Resultados del coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato a partir de la idealización de 3 ensayos.	293

111. Máximos obtenidos en los coeficientes de rendimiento de biomasa sobre sustrato a partir de la idealización de 3 ensayos.	294
112. Resultados de la rapidez volumétrica de consumo de sustrato a partir de la idealización de 3 ensayos.	295
113. Resultados de la rapidez específica de consumo de sustrato a partir de la idealización de 3.	296
114. Cuantificación de azúcares totales por el método de fenol – sulfúrico en 3 ensayos idealizados.	297
115. Resultados de la rapidez específica de crecimiento a partir de la idealización de 3 ensayos.	299
116. Crecimiento microbiano por el método del peso seco en 3 ensayos idealizados.	300
117. Concentraciones máximas y porcentajes de producción obtenidos en 3 ensayos idealizados.	302
118. Resultados del coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato a partir de la idealización de 3 ensayos.	303
119. Resultados de la rapidez volumétrica de formación de producto a partir de la idealización de 3 ensayos.	305
120. Resultados de la cuantificación de riboflavina a partir de la idealización de 3 ensayos.	306

121. Resultados de la rapidez específica de formación de
producto a partir de la idealización de 3 ensayos.

309

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la cinética del proceso de producción microbiológica de la riboflavina (vitamina B₂), por medio de la acción metabólica de la ***Candida utilis***. Dicho trabajo se llevó a cabo en tres etapas: Investigación bibliográfica, investigación de campo y parte experimental. En la primera etapa se recopiló toda la información necesaria para definir los fundamentos de la cinética de crecimiento microbiano, características físico-químicas de la riboflavina, microorganismos productores, métodos de producción y condiciones de crecimiento, así como la importancia y funciones fisiológicas de la vitamina B₂. En la segunda etapa se realizó un muestreo puntual dirigido a la obtención de cáscara de piña, la cual fue procesada para ser utilizada como medio de producción y cultivo. Dicho muestreo se realizó en el mercado central de zacatecoluca.

En la parte experimental se utilizó la modalidad de cultivo por lotes, usando como microorganismo productor la ***Candida utilis*** y como medio de fermentación o producción jugo de cáscara de piña. Se realizaron tres ensayos, variando la composición del medio de producción en cada uno (adición de sustratos) con el objetivo de evaluar el efecto de los aditivos en el proceso.

Las variables a evaluar fueron: Crecimiento microbiano, consumo de nutrientes, formación de productos, rendimiento de producto y biomasa sobre sustrato. Para evaluar las variables antes mencionadas, se hizo uso de técnicas

analíticas químicas, gravimétricas y espectrofotométricas. La mayor producción de biomasa se obtuvo a las 130.36 horas del ensayo 1 (sin aditivos), con una producción de 1.946 g/L equivalente a un aumento porcentual de biomasa de 96.81%. La eficacia de conversión de sustrato en biomasa se optimizó adicionando sulfato de amonio (5.0 g/L) y fosfato trisódico (0.2 g/L) al medio de producción (ensayo 3), de esta forma tenemos que a las 108.23 horas del proceso se obtuvo un máximo de 367.50g de biomasa generada por cada gramo de sustrato consumido.

La ***Candida utilis*** produce riboflavina como producto de su metabolismo durante las primeras horas del proceso, siendo los máximos valores observados de 1.9458 mg/L a las 33.31 horas, 2.2206 mg/L a las 14.29 horas y 2.0271 mg/L a las 11.99 horas para los ensayos 1, 2 y 3 respectivamente. Según lo observado, la mayor producción de riboflavina se obtuvo al adicionar sacarosa (1.0%) al medio de producción (ensayo 2). Los resultados obtenidos durante el proceso fermentativo, revelaron un bajo rendimiento en la producción de riboflavina, las concentraciones obtenidas no fueron lo suficientemente significativas como para considerar aplicaciones prácticas de este proceso, por lo que es recomendable el estudio y evaluación de otras técnicas de producción. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y se realizó a partir de las diferentes etapas de un proceso fermentativo de siete días de duración.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que afronta el país es la desnutrición infantil debido a la carencia de alimentos en cantidad y calidad adecuados. Algunos departamentos de El Salvador tienen tasas de desnutrición crónica infantil por encima del promedio nacional (Anexo N° 1). Entre los factores causantes de problemas de nutrición destaca la avitaminosis, ya que sin una ingesta adecuada de vitaminas el organismo no es capaz de aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por medio de la alimentación. Debido a esto es necesario realizar estudios para el desarrollo de suplementos vitamínicos de bajo costo, de manera que se contribuya a suplir las necesidades vitamínicas de las poblaciones más vulnerables a padecer de desnutrición por avitaminosis.

Una de las principales vitaminas incluidas en la formulación de suplementos vitamínicos es la riboflavina (vitamina B₂), ya que esta participa en los procesos de respiración celular, ayuda al crecimiento, mejora el estado de la piel y junto con otras vitaminas promueve la reparación de los tejidos y ayuda a liberar la energía de los carbohidratos. Esta vitamina es de gran importancia por su uso en el tratamiento terapéutico de la avitaminosis en humanos y es parte importante de la alimentación en general. Ya que desde el punto de vista industrial es más conveniente la obtención de riboflavina por procesos de fermentación que por síntesis química, algunos investigadores se han dedicado

al desarrollo de métodos fermentativos para la obtención de dicha vitamina, así por ejemplo tenemos el trabajo de Contasti Piñango V, quien utilizó como microorganismo productor la ***Candida guilliermondii***, usando como medio de fermentación jugo de nepe, obteniendo como máximo 1,5 por ciento (p/v) sobre la concentración ya observada en el medio.

También destacan los trabajos de Lara J. y Hernández R, el primero utilizó como microorganismo productor el ***Ashbya gossypii ATCC 10895***, usando un medio de producción compuesto por sacarosa 1.5%, aceite de maíz 2%, extracto de malta 0.5%, extracto de levadura 0.5% y fosfato diamónico 0.025%, obteniendo un valor máximo de 125 µg/ml de riboflavina. Mientras que Hernández R. utilizó como microorganismo de trabajo la ***Saccharomyces cerevisiae***, usando como medio de fermentación el jugo contenido en cáscaras de piña, obteniendo un valor máximo de 4.56 mg/ml de riboflavina.

Con el presente trabajo de investigación se pretende proporcionar estrategias para la producción y optimización del proceso de obtención de riboflavina por método fermentativo, a través de una evaluación de la cinética del proceso, utilizando como microorganismo productor la ***Candida utilis YP900*** y jugo de cáscara de piña como medio de fermentación.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Evaluar la cinética del proceso de producción microbiana de la riboflavina (vitamina B₂), por medio de la acción metabólica de la *Candida utilis*.

2.2 Objetivos específicos.

- 2.2.1 Describir la cinética de crecimiento microbiano: Generación de biomasa, consumo de nutrientes y formación de productos.
- 2.2.2 Cuantificar el rendimiento de producto y biomasa sobre sustrato.
- 2.2.3 Elaborar curvas que permitan analizar los diferentes parámetros de la cinética de crecimiento microbiana.
- 2.2.4 Proponer modelos que describan el comportamiento de la cinética de crecimiento durante el proceso de producción de la riboflavina.
- 2.2.5 Describir la capacidad de la *Candida utilis* para producir riboflavina en el medio de fermentación seleccionado.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Consecuencias de la desnutrición. ⁽²⁹⁾

Los niños que padecen desnutrición en los primeros 5 años de vida, sufren consecuencias irreversibles que limitan sus posibilidades de superación (Anexo N° 2), entre las cuales tenemos:

- Disminución en el coeficiente intelectual
- Problemas de aprendizaje
- Disminución de la retención y memoria
- Escaso desarrollo muscular y baja estatura
- Propensión a contraer enfermedades infecciosas (La desnutrición debilita el sistema inmunológico de los niños)

En adolescentes la desnutrición puede ocasionar trastornos físicos y mentales que pueden dar como resultado:

- Escaso desarrollo muscular y baja estatura
- Menor rendimiento escolar e intelectual (El sentimiento de fracaso e inhabilidad de avanzar en la escuela contribuye a la deserción escolar)
- Menor desempeño en trabajo físico
- Mayor riesgo a padecer enfermedades crónicas en la edad adulta.

3.2 Datos recientes. (14, 23, 25)

Según datos emitidos por el Programa Mundial de Alimentos (PMA), en octubre del año 2001, en nuestro país la desnutrición constituye un problema serio en la población y arriba del 50% de nuestros niños adolecen de algún grado de desnutrición, pero este flagelo nos ha acompañado durante mucho tiempo.

Para Octubre del 2002 UNICEF advirtió que la malnutrición infantil afecta a 8 de cada 10 menores salvadoreños y aumenta de manera alarmante en zonas de este país centroamericano, debido a la crisis de los precios del café que ha dejado sin empleo a miles de familias. Según Juan Carlos Espinola, representante del Fondo de Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) en El Salvador, el nivel de malnutrición en este país centroamericano, debido a la crisis cafetalera, pasó de 15 por ciento a 65 por ciento de la infancia y en algunas zonas supera el 80 por ciento. y, en algunos casos, como en Ahuachapán, ha habido algunas muertes, dijo Espinola.

El director ejecutivo del Programa Mundial de Alimentos (PMA), James Morris, confirmó en el 2005, que el índice de desnutrición infantil (es decir, menores de cinco años) en El Salvador es del 19%, una cifra “tremendamente alta”, según su análisis. No es todo, en el país hay, en total 1.2 millones de personas con problemas de desnutrición. El residente del PMA confirmó que los departamentos en los que se ubica la mayor cantidad de niños desnutridos es la zona central de Ahuachapán, el sur de Santa Ana y el norte de Sonsonate; así como las zonas norte de Cabañas, San Miguel y Morazán.

3.3 Vitaminas y nutrición. ⁽²⁷⁾

El término Vitamina se le debe al Bioquímico polaco Casimir Funk quien lo planteó en 1,912. Consideraba que eran necesarias para la vida (vita) y la terminación Amina es porque creía que todas estas sustancias poseían la función Amina. Son sustancias indispensables en la nutrición de los seres vivos; no aportan energía, pero sin ellas el organismo no podría aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por medio de la alimentación.

Las Vitaminas son esenciales en el metabolismo y necesarias para el crecimiento y para el buen funcionamiento del cuerpo. Solo la Vitamina D es producida por el organismo, el resto se obtiene a través de los alimentos.

Todas las vitaminas tienen funciones muy específicas sobre el organismo y deben estar contenidas en la alimentación diaria para evitar deficiencias. No hay alimento mágico que contenga todas las vitaminas, solo la combinación adecuada de los grupos de alimentos hacen cubrir los requerimientos de todos los nutrimentos esenciales para la vida.

Tener una buena alimentación es indispensable para el desarrollo de todas nuestras habilidades físicas y mentales; además la deficiencia de vitaminas puede llevarnos a contraer enfermedades graves que podríamos corregir con una alimentación balanceada. La carencia de vitaminas se denomina **Hipovitaminosis** y el exceso de alguna de ellas puede producir **Hipervitaminosis**.

3.4 Riboflavina.

3.4.1 Generalidades. ⁽²⁴⁾

Desde 1,879 en adelante, se han aislado series de compuestos con pigmento amarillo a partir de diversas fuentes, y se han denominado **flavinas**, con un prefijo que indica la fuente (p. ej., lacto, ovo y hepato). Después se ha demostrado que esas diversas flavinas tienen idéntica composición química. Entre tanto, la vitamina B hidrosoluble se ha separado en un factor termolábil contra beriberi (B₁) y un factor termoestable que favorece el crecimiento (B₂), y a la postre se apreció que los concentrados de la llamada vitamina B₂ tenían color amarillo. Todas las dudas con respecto a la identidad de la vitamina B₂ y las flavinas que ocurren de manera natural, se eliminaron cuando se sintetizó la **Lactoflavina**, y se demostró que el producto sintético posee actividad biológica completa. La riboflavina fue aislada por Khun y sus colaboradores en 1,933 a partir de la clara de huevo y dilucidaron su estructura tan solo dos años después. La vitamina se denominó riboflavina debido a la presencia de ribosa en su estructura.

3.4.2 Estructura química. ^(6,7)

La riboflavina, llamada también vitamina B₂, vitamina G o Lactoflavina es la **6,7-dimetil-9-(D, 1'-ribitol)-isoaloxacina**. Su fórmula empírica es C₁₇H₂₀N₄O₆ y su fórmula estructural es la siguiente:

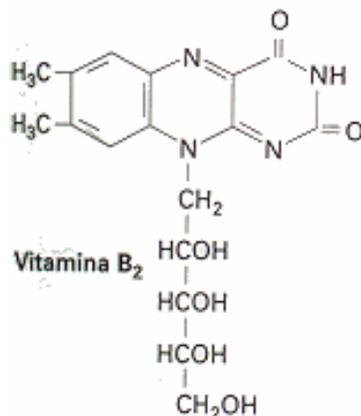


Figura N° 1: Estructura química de la riboflavina.

La riboflavina esta formada por el anillo doble nitrogenado heterocíclico condensado de la pteridina, con el que se condensa además un anillo bencénico, originándose así un sistema de tres anillos condensados con dobles enlaces conjugados. El átomo de nitrógeno que se encuentra en posición 9 está unido a una cadena ribitol, de ahí el nombre de riboflavina.

3.4.3 Características y propiedades físico-químicas. ⁽⁷⁾

La riboflavina es un polvo cristalino en forma de agujas de color amarillo o amarillo-naranja con un punto de fusión de 282 °C. Tiene un peso molecular de 376.37 g / mol. La riboflavina es soluble en agua pero insoluble en acetona, cloroformo, éter y benceno. Dependiendo de la forma de los cristales, la solubilidad de la riboflavina en agua varía de una parte en 3000 a una parte en 15000.

3.4.4 Fuentes. ⁽¹³⁾

Se encuentra en casi todos los alimentos, es producida por bacterias, levaduras y vegetales que contengan pigmentos amarillos. Se encuentra en grandes cantidades en los productos lácteos, levaduras y en el germen de los cereales, así como en el organismo de los mamíferos y del hombre en los órganos con una actividad respiratoria intensa como hígado, riñones y corazón (tabla N° 1).

**TABLA N° 1: ALIMENTOS RICOS EN VITAMINA B2/RIBOFLAVINA.
CANTIDAD RECOMENDADA POR DÍA:1300-1800 NG
(CANTIDADES EXPRESADAS EN NG/100 GR.**

Vísceras y despojos cárnicos	3170	Champiñones	440
Levadura de cerveza	2070	Mijo	380
Germen de trigo	810	Quesos curados y semicurados	370
Almendras	700	Salvado	360
Coco	600	Huevos	310
Quesos grasos	550	Lentejas	260

3.4.5 Métodos de producción. ⁽⁶⁾

Se puede producir mediante síntesis química o por fermentación directa (biosíntesis), sometiendo medios nutritivos escogidos a fermentación por la acción metabólica de diversos microorganismos. Se conocen 3 grupos de microorganismos que sintetizan riboflavina en cantidades importantes:

- Las bacterias del grupo butanol-acetona, cuyo representante principal es el ***Clostridium acetobutylicum***.
- Ciertas levaduras del género candida.
- Dos hongos a fines a las levaduras: ***Eremothecium ashbyii*** y ***Ashbya gossypii***.

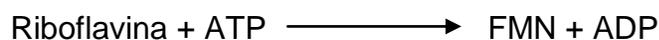
3.4.6 Funciones fisiológicas. ⁽²⁴⁾

La vitamina B₂ participa en los procesos de respiración celular, desintoxicación hepática, desarrollo del embrión y mantenimiento de la envoltura de los nervios. También ayuda al crecimiento y la reproducción, mejora el estado de la piel, las uñas y el cabello. Junto con otras vitaminas, promueve la reparación de los tejidos y ayuda a liberar de energía de los carbohidratos.

3.4.7 Acción bioquímica. ^(24, 28)

La riboflavina lleva a cabo sus funciones en el organismo en forma de una u otra de dos coenzimas, riboflavina fosfato, que suele llamarse **flavina mononucleótido (FMN)** y **flavina adenina dinucleótido (FAD)** (figura N° 2).

La riboflavina se convierte en flavina mononucleótido y flavina adenina dinucleótido mediante dos reacciones catalizadas por enzimas, que se muestran como:



La **flavina mononucleótido** y la **flavina adenina dinucleótido**, las formas de riboflavina con actividad fisiológica desempeñan una función vital en el metabolismo como coenzimas para una amplia variedad de flavoproteínas respiratorias, algunas de las cuales contienen metales (p. ej., xantinoxidasa).

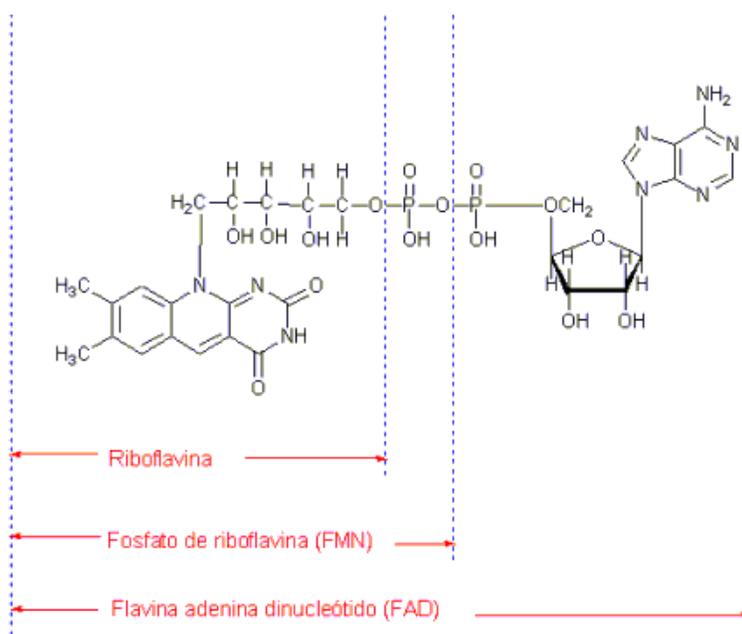


Figura N° 2: Estructura de la riboflavina, FMN y FAD. Tomado de Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica.

Estas coenzimas son esenciales para:

- El sistema enzimático respiratorio.
- La degradación oxidativa de ácidos grasos de cadenas cortas.
- El transporte de oxígeno de los tejidos.
- La oxidación y conversión de aminoácidos en alfacetoácidos.
- La oxidación de las purinas.
- El mantenimiento del epitelio y de las mucosas.

3.4.8 Metabolismo. ⁽²⁴⁾

La riboflavina se absorbe con facilidad a partir de la parte alta del tubo digestivo, mediante un mecanismo de transporte específico que comprende fosforilación de la vitamina hacia flavina mononucleótido. En esos tejidos y en otros, la riboflavina se convierte en flavina mononucleótido mediante la flavoquinasa, reacción sensible al estado en cuanto a hormona tiroidea, y que queda inhibida por la clorpromazina y por antidepresores tricíclicos; el antipalúdico quinacrina también interfiere en la utilización de riboflavina. Esta última se encuentra distribuida en todos los tejidos, pero las concentraciones son uniformemente bajas y se almacena poca. Cuando se ingiere riboflavina en cantidades que se aproximan al requerimiento diario mínimo, sólo alrededor de 9% aparece en la orina. A medida que el consumo de riboflavina aumenta por encima del requerimiento mínimo, una proporción más grande se excreta sin cambios. El ácido bórico, una sustancia química que suele usarse en el hogar, forma un complejo con la riboflavina y favorece su excreción urinaria. La intoxicación por ácido bórico puede inducir deficiencia de riboflavina.

La riboflavina se encuentra en las heces. Esta quizá constituye la vitamina sintetizada por microorganismos intestinales, puesto que, en ingestiones bajas de riboflavina, la cantidad que se excreta en las heces excede a la que se ingiere. No hay pruebas de que la riboflavina sintetizada por las bacterias del colon pueda absorberse.

3.4.9 Deficiencia. (24, 28)

Suelen ser deficitarios los bebedores o fumadores crónicos y las personas que siguen una dieta vegetariana estricta (sin huevos ni leche) y no toman suplementos de levadura de cerveza o germen de trigo. La deficiencia de riboflavina puede tener origen en distintas situaciones:

- Por ingesta inadecuada (Se observa en países orientales)
- Alcoholismo crónico, el que da lugar a una disminución de la absorción y de su biodisponibilidad.
- Secundaria a la ingesta de medicamentos, tales como clorpromacina, amitriptilina, y ciertas drogas anticancerígenas que alteran el metabolismo de la proteína.
- Sepsis, politraumatizados y pacientes en diálisis (Por aumento de la excreción)
- Hipotiroidismo, Diabetes.
- Beta talasemia.
- Fototerapia utilizada para el control de la hiperbilirrubinemia neonatal, fenómeno que causa la destrucción de la riboflavina.

Su carencia se manifiesta con síntomas de piel, dermatitis seborreica y acné, lesiones de las mucosas, queilosis, estomatitis angular y lesiones oculares, trastornos de la visión, vascularización de la córnea. El conjunto de síntomas se llama **arriboflavinosis**.

Si hay una deficiencia, por lo general, aparecen primero mal de garganta y estomatitis angular. Más tarde, sobrevienen glositis, queilosis (labios denudados y rojos), dermatitis seborreica de la cara, y dermatitis sobre el tronco y las extremidades, seguidas por anemia y neuropatía. En algunos sujetos, son notorias la vascularización corneal y la formación de cataratas.

La anemia que aparece en la deficiencia de riboflavina es normocrómica y normocítica y se relaciona con reticulocitopenia; los leucocitos y las plaquetas suelen ser normales. La administración de riboflavina en pacientes con deficiencia causa **reticulocitosis**, y la concentración de hemoglobina vuelve a lo normal. En sujetos con deficiencia de riboflavina, la anemia puede relacionarse, al menos en parte, con alteraciones del metabolismo del ácido fólico.

3.4.10 Requerimientos diarios. ⁽²⁴⁾

El ***Dietary Allowances Committee del National Research Council*** recomienda ingestión de riboflavina de 0.6 mg/1000 kcal, que es equivalente a alrededor de 1.6 mg/día para varones adultos jóvenes, y de 1.2 mg/día para mujeres adultas jóvenes. En ancianos se recomienda que el consumo no sea menor de 1,2 mg/día, incluso cuando la ingestión de calorías disminuye por debajo de 2000 kcal. El recambio de riboflavina parece relacionarse con el gasto de energía, y los periodos de actividad física aumentada se relacionan con incremento moderado del requerimiento.

3.4.11 Cuadro clínico de personas con arriboflavinosis. ^(24, 28)

Los síntomas característicos son la estomatitis angular, queilosis, dermatitis seborreica, vascularización corneal, retraso mental, alteraciones hematológicas (anemia microcítica normocrómica), alteraciones oculares (fotofobia, opacidad corneal y cataratas preseniles). El problema en el reconocimiento clínico de la deficiencia de riboflavina es que algunos datos, como glositis y dermatitis, son manifestaciones frecuentes de otras enfermedades, entre ellas deficiencias de otras vitaminas. También es difícil reconocer deficiencia de riboflavina, porque rara vez ocurre de manera aislada. En encuestas nutricionales de niños en un área urbana, y de pacientes hospitalizados seleccionados al azar, se observó a menudo deficiencia de riboflavina, pero casi siempre junto con deficiencias de otras vitaminas. De igual modo, se encontró deficiencia de riboflavina en relación con deficiencias de otras vitaminas en una proporción grande de alcohólicos con estado socioeconómico bajo que vivían en zonas urbanas. Se han observado datos bioquímicos de deficiencia de riboflavina en recién nacidos tratados con luz ultravioleta por **hiperbilirrubinemia**. Los lactantes alimentados al pecho materno son más sensibles a este problema debido al contenido relativamente bajo de riboflavina en la leche materna. El estado en cuanto a riboflavina se valora al correlacionar los antecedentes con respecto a dieta, con los datos clínicos y de laboratorio.

3.4.12 Pruebas de laboratorio. (24, 28)

Las pruebas bioquímicas incluyen valoración de la excreción urinaria de la vitamina (la excreción menor de 50 mg/día de riboflavina indica deficiencia). Un adulto normal excreta en 24 horas 120 microgramos de vitamina B₂ por día. Cuando la excreción es inferior a 40 microgramos de riboflavina por gramo de creatinina se puede afirmar que existe un estado cierto de deficiencia.

Si bien las concentraciones sanguíneas de flavinas no tienen utilidad diagnóstica, una prueba de activación de enzimas que utiliza glutatión reductasa, proveniente de eritrocitos, se correlaciona bien con el estado en que se encuentre la riboflavina.

3.4.13 Tratamiento. (28)

El déficit clínico se trata con 10 a 15 mg de riboflavina por día por, vía oral. La vía endovenosa se utiliza cuando existen problemas intestinales que dificultan su absorción.

3.4.14 Toxicidad. (28)

No han sido descritos casos de toxicidad por efectos de sobredosis de riboflavina.

3.4.15 Identificación. ^(7, 12)

Una solución de 1 mg en 100 ml de agua es amarillo verdoso pálido por luz transmitida, y presenta un intenso color verde amarillento fluorescente bajo luz ultravioleta, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de la vitamina en la solución diluida. El color y la fluorescencia desaparecen con la adición de ácidos minerales o álcalis y reaparecen al agitar en aire.

3.4.16 Determinación de riboflavina. ⁽⁷⁾**3.4.16.1 Medición fotométrica del color amarillo de la riboflavina.**

El color amarillo natural de la riboflavina en una solución neutra o suficientemente acida exhibe una absorción máxima a 223, 267, 374 y 445 nm, en particular a 445nm. El principal defecto de este método es su baja sensibilidad comparada con el método Fluorométrico. El color amarillo de la riboflavina puede medirse de forma directa o por el método de adición de Hidrosulfito de sodio.

Método directo.

El color amarillo de la riboflavina obedece la ley de Beer y el método es aplicable a preparaciones que no contengan sustancias de interferencia. La cantidad de riboflavina en la muestra es encontrada por referencia a una curva estándar de riboflavina.

Método del hidrosulfito de sodio.

La reducción con hidrosulfito de sodio convierte a la riboflavina a su **forma leuco**, la cual no es fluorescente en la región visible. Esto puede ser usado ampliamente en fluorimetría y es incluido en el método USP. La banda de absorción a 445 nm en cual da fluorescencia también es afectada. La reducción es vigorosa, lo suficiente para afectar otros materiales usualmente presentes. Sin embargo es posible oxidar la forma leuco de nuevo a riboflavina por una muy suave oxidación, la cual es específica para la riboflavina y forma la base de este método. En aireación, la **Leuco-riboflavina** se oxida, el color amarillo reaparece y muestra el mismo aspecto que la riboflavina original. La diferencia entre las dos lecturas es comparada con la obtenida con riboflavina pura bajo idénticas condiciones.

3.4.16.2 Método de la lumiflavina.

Este método está basado en el hecho de que la riboflavina insoluble en cloroformo, al ser irradiada en solución alcalina se produce **Lumiflavina** soluble en cloroformo (figura N° 3). La reacción es específica y sensible, otras flavinas presentes en la solución no son afectadas por el tratamiento. La solución es acidificada después de la irradiación y la lumiflavina así formada de la riboflavina es extraída con cloroformo. La absorbancia es medida fotométricamente o se determina la fluorescencia. El máximo de absorbancia es a 450 nm y el máximo de fluorescencia es a 513 nm. Dado que el método

fluorimétrico es muy sensible comparado con el método fotométrico, este es aplicado solamente a soluciones diluidas. En preparaciones farmacéuticas la riboflavina esta presente en suficientes cantidades, de ahí generalmente la determinación se lleva a cabo fotométricamente por medición de absorbancias a 450 nm. La siguiente reacción tiene lugar cuando la riboflavina es irradiada en solución alcalina:

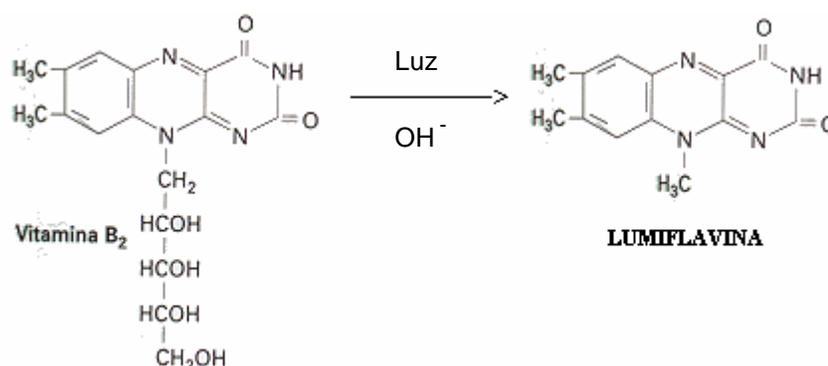


Figura N° 3: Conversión de la riboflavina en lumiflavina.

Para obtener resultados confiables y reproducibles, todas las soluciones muestra deben ser irradiadas bajo idénticas condiciones. Durante la irradiación las condiciones mas importantes incluyen el tipo de lámpara y su producción total de luz, temperatura de la solución, tiempo de irradiación, distancia entre la superficie del líquido y la fuente. Una lámpara de entre 60 y 1000W es recomendada para la irradiación. Una lámpara poderosa naturalmente produce una mayor cantidad de lumiflavina, pero también produce demasiado calor, el cual descompone la lumiflavina o riboflavina en solución alcalina. La fuente

ideal para la irradiación es un tubo fluorescente de baja presión, el cual emite luz brillante sin emitir demasiado calor. La cantidad de riboflavina en la muestra es encontrada por referencia a una curva de calibración de riboflavina tratada de la misma forma que las muestras.

3.4.16.3 Determinación espectrofotométrica usando Sulfato Mercúrico (Reactivo de Denige) o Nitrato de Plata.

Dado que la riboflavina es una Imida, reacciona fácilmente con sulfato mercúrico (Reactivo de Denige) o con Nitrato de Plata. El color rojo-naranja producido por el primero y un color rojo-ladrillo producido por el último obedecen la ley de Beer. La cantidad de riboflavina en la muestra es encontrada por referencia a una curva de calibración de riboflavina. Con sulfato mercúrico se formará un complejo de la formula estructural siguiente:

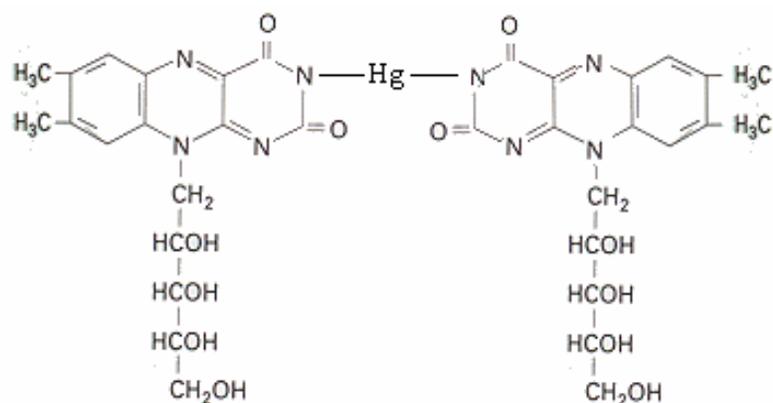


Figura N° 4: Complejo riboflavina – mercurio.

Las siguientes sustancias no interfieren en la determinación: Aminoácidos como la glicina, alanina, isoleucina; carbohidratos como la glucosa, lactosa, sucrosa y almidón; ácido ascórbico, acetona, urea, ácido úrico, etil acetato y el éster acetoacético. Con el reactivo de Denige, el color se produce inmediatamente a temperatura ambiente y permanece estable por más de 24 horas y no es afectado por la acción del calor. La sensibilidad de la prueba es de 1: 400,000; un color rojo-naranja se forma en soluciones concentradas y un color amarillo en soluciones diluidas. El reactivo de Denige puede ser reemplazado con una solución acuosa de nitrato de plata al 10%, el cual da un color rojo-ladrillo. Sin embargo el nitrato de plata puede ser usado solo en medios neutros o entre pHs de 6.5 y 7.4. La presencia de ácidos como el acético, oxálico o tartárico impiden el desarrollo del color. La sensibilidad de la reacción de color es alrededor de 2 µ/ml de riboflavina. La reacción procede estequiométricamente en una relación de 1 a 1 y resulta en la formación de un complejo de la fórmula: $R\text{Ag}.1/2\text{H}_3\text{O}$. La adición de cloruro de sodio o de hidróxido de sodio 0.1N no afecta el color y ningún cloruro de plata, ni óxido de plata es precipitado.

3.5 Levaduras.

3.5.1 Generalidades. ^(1, 17)

Se llama levadura al organismo vivo, generalmente un grupo de hongos **Ascomycetes** pertenecientes al orden **Endomycetales**, que produce enzimas, los cuales provocan cambios bioquímicos importantes en productos orgánicos

naturales: fermentación. Son capaces de transformar los azúcares en alcohol y CO₂. Se multiplican por gemación o estrangulamiento cada 3 horas. Las levaduras son abundantes a través del ambiente. Pueden ser encontradas en los granos de cereal, subproductos del grano, heno y están incluso presentes en el suelo y el agua. Se les dan nombres latinos que representan su género y especie, por ejemplo **Saccharomyces cerevisiae** o **Cándida utilis**. Las especies se diferencian de su morfología o forma celular (figura N° 5), de cómo metabolizan diversos sustratos y como se reproducen.

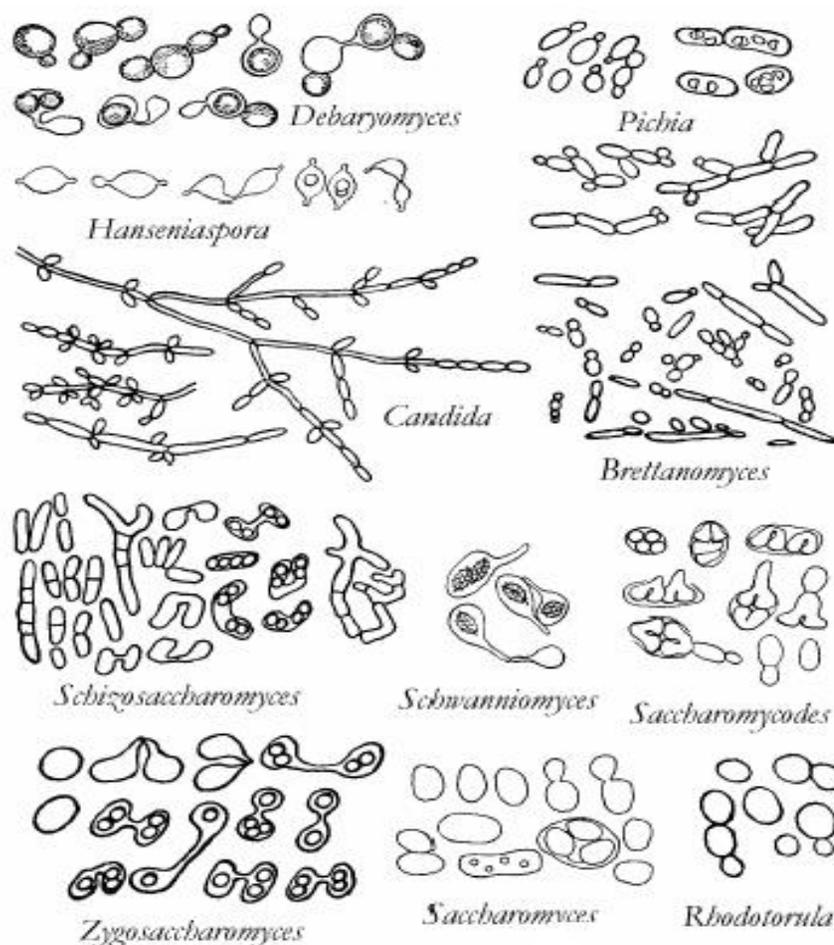


Figura N° 5: Morfología de diversos géneros de levaduras.

Mientras que hay casi 50,000 especies de hongos, hay solamente 60 diversos géneros de levaduras que representan cerca de 500 especies. La mayoría de las levaduras son saprofitas benignas y se ha probado que no son dañinas al hombre.

3.5.2 Descripción de una célula de levadura. ⁽¹⁷⁾

La célula de levadura está envuelta por una membrana exterior denominada pared celular. La membrana celular que regula los cambios de la célula con el medio exterior permite la entrada de nutrientes a la célula; y el CO₂ y el alcohol son evacuados. La membrana celular regula por procesos osmóticos (fenómeno de difusión entre dos soluciones de concentración diferente) la cantidad de agua contenida en la célula. El citoplasma es la parte fundamental viva de la célula y contiene:

- Un núcleo con los cromosomas (material genético).
- Algunas vacuolas, pequeños cuerpos elípticos llenos de jugo celular que constituyen las reservas nutritivas.
- Otros orgánulos, los ribosomas, las mitocondrias.

Las enzimas que se producen a nivel de citoplasma son:

- La **maltasa** que transforma la maltosa que penetra en la célula en glucosa.
- La **invertasa** que transforma la sacarosa en glucosa y fructosa.

- La **zimasa** que transforma la glucosa en fructosa y la descompone en alcohol y CO₂.

Antes de la división de la célula, los cromosomas se sitúan en medio del núcleo y después se dividen en dos partes iguales. Se forma una pared entre las dos mitades de núcleo y éste se divide en dos. Durante este tiempo empieza la gemación. Cuando la yema tiene el suficiente tamaño acoge uno de los nuevos núcleos antes de separarse de la célula madre para dar lugar a una nueva célula. Este tipo de multiplicación se denomina reproducción asexual y permite a una célula madre engendrar 17 millones de células en 72 horas.

3.5.3 Historia de las levaduras. (17, 21)

Sin duda desde la Prehistoria los hombres utilizan con provecho las fermentaciones. El pan fermentado se conoce desde hace varios miles de años. Los jeroglíficos egipcios, así como representaciones gráficas en todo el Próximo Oriente atestiguan que el hombre recurría a la fermentación para fabricar bebidas alcohólicas ya varios milenios antes de Jesucristo. Al preparar el pan, vino, cerveza o sake, los egipcios, sumerios y todas las personas hasta mediados del Siglo XIX, empleaban sin saberlo, y de una manera empírica, una familia de agentes biológicos muy originales: las levaduras. Son ellas las que realizan la fermentación alcohólica. El arte de hacer pan con levadura se propagó rápidamente por los países que bordean el Mediterráneo, de manera

muy especial en Grecia. No obstante fueron los romanos quienes transmitieron estos conocimientos a la Europa Occidental. En el siglo XVII, los panaderos utilizaban la levadura de cerveza líquida, elaborada a partir de una mezcla de grano germinado y agua. Esta levadura presentaba el inconveniente de que confería un sabor amargo al pan. Hasta el siglo XIX no se encuentra una levadura capaz de reemplazar a la de cerveza. La primera levadura seca fue producida en los Países Bajos y era un subproducto de destilería. Su descubrimiento supuso un logro importante, pero debido a su delicada conservación su uso se limitaba a un pequeño perímetro alrededor de las destilerías.

En 1,874, en Viena, se empieza a fabricar una levadura mejor adaptada a la panificación que daría como resultado el denominado Pan de Viena. Hacia 1,856, los trabajos de Louis Pasteur permitieron explicar científicamente los fenómenos de fermentación y comprender lo que ocurre misteriosamente en el interior de la masa. Este descubrimiento permitió a la vez fabricar levadura científicamente a partir de una célula de variedad especial para panificación.

El papel de las levaduras como agentes fermentadores no fue reconocido hasta 1,856 por Luís Pasteur. Las teorías científicas de esa época reconocían la presencia de levaduras en la fermentación alcohólica, pero estas levaduras eran consideradas como compuestos químicos complejos, sin vida. Esta era la teoría mecanística liderada por los químicos alemanes von Liebig y Wöhler. Luís Pasteur, químico francés, propuso la teoría vitalística y demostró que las

células viables de levaduras causan fermentación en condiciones anaeróbicas; durante dicha fermentación el azúcar presente en el mosto es convertido principalmente en etanol y CO₂. Sus ilustraciones claramente muestran auténticas levaduras vínicas y en sus escritos él las diferenciaba claramente de otros componentes. Hoy, los cultivos puros de levaduras crecen específicamente para ser utilizados en cervecerías, destilerías, panaderías y para el uso casero.

3.5.4 Productos alimenticios de las levaduras. ⁽¹⁾

Las células de la levadura han contribuido al valor alimenticio de alimentos fermentados, como el pan y la cerveza. En algunas sociedades, las cervezas "nubladas" hacen una contribución importante a las necesidades alimenticias diarias. El sedimento nublado de las células de la levadura proporciona vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales.

- Levadura irradiada.

Aunque la levadura no es una fuente de vitamina D, contiene un esteroide, el ergosterol, que se convierte en la vitamina D₂ (Ergocalciferol) cuando es irradiado con luz ultravioleta. En el pasado, la levadura seca irradiada sirvió como fuente importante de la actividad de la vitamina D, hasta que fue creada una forma sintética de esta vitamina (Colcalciferol).

- Levadura del selenio.

La levadura es una buena fuente del selenio dietético. El selenio en la levadura está generalmente en la forma de Selenometionina, que es una molécula del aminoácido de la metionina que contiene Selenio. El selenio se requiere para la activación de un sistema enzimático que produce efectos protectores en el hígado y otros tejidos finos. El selenio previene el daño oxidativo de la membrana de la célula y del envejecimiento prematuro subsecuente de la célula.

El selenio de la levadura utilizada en los procesos de fabricación de cerveza desempeñó un papel importante en la nutrición animal, especialmente en la fabricación de alimentos para animales para consumo domestico. El hecho de que la levadura de los cerveceros contiene cantidades apreciables de vitaminas y de selenio, se consideró para la inclusión en muchas formulaciones para la alimentación del ganado. Fue utilizada con frecuencia como una fuente natural del selenio antes de que se utilizara extensamente el selenito de sodio.

Las levaduras comerciales que contienen altas cantidades de selenio, que se conocen como levaduras del "Selenio alto", son manufacturadas y vendidas a través de almacenes de alimento natural y agregadas a veces a las tabletas de suplemento de vitaminas. Mientras que la levadura de los panaderos puede contener una o dos partes por millón de selenios, las levaduras comerciales del "Selenio alto" están disponibles conteniendo selenio en cantidades de dos partes por millón.

- Levadura del Cromo.

El cromo en la levadura esta presente en la forma orgánica llamada " el factor de la tolerancia de la glucosa " y es importante en la regulación del metabolismo del azúcar. Consiste en el cromo trivalente y parece actuar conjuntamente con la insulina para facilitar el metabolismo eficiente de carbohidratos. Aunque no se sabe exactamente como trabaja, los estudios indican que los individuos que consumen el cromo en forma orgánica tienen una reducción en la dependencia de azúcar, de la insulina de la sangre, una reducción en el colesterol y los triglicéridos. Investigaciones han indicado que el cromo orgánico puede reducir la tensión en el ganado.

- Levadura seca activa.

La levadura seca activa (materia seca al 95%) es la levadura disponible para la industria de la alimentación. Aunque la levadura con un alto contenido de humedad (torta mojada), es utilizada extensivamente por la industria de la panadería, la levadura seca activa es la forma de levadura utilizada para la alimentación animal.

3.5.5 Identificación de levaduras. (20)

Para identificar una levadura se parte de cultivos puros. Se debe tener en cuenta siempre tres características:

- a) Morfología: forma, medida, reproducción asexual.
- b) Características de reproducción sexual.
- c) Características fisiológicas o bioquímicas.

a) Morfología.

El aspecto de las colonias de las levaduras suele ser de color blanco crema, más o menos lisas, de aspecto seco o plegado, y de tamaño variable (figura N° 6). Por ello, el aspecto morfológico de la colonia no presenta habitualmente un carácter distintivo importante.



Figura N° 6: Morfología de las colonias de levadura.

Microscópicamente sus células suelen ser esféricas o alargadas (figura N° 7), y se debe ver alguna gema (célula con otra al lado o encima). Tienen tendencia a depositarse en el fondo del líquido o flotar. Suelen formar cápsula (tinción negativa con tinta china o separación entre la tinta y la célula).

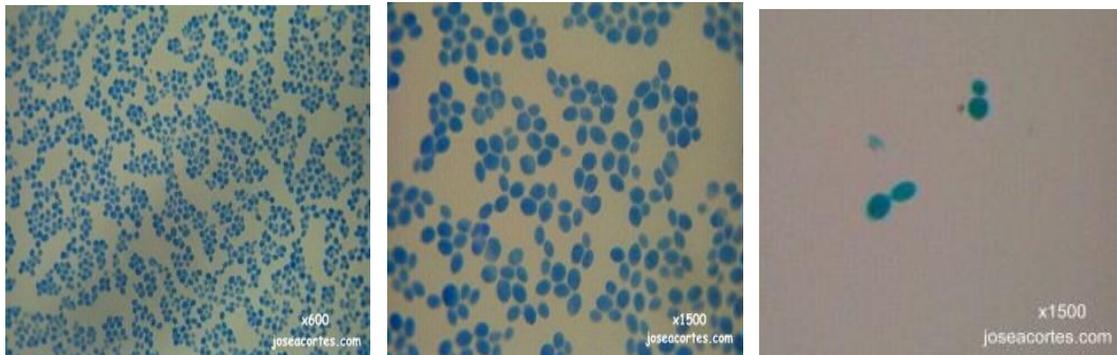


Figura N° 7: Imágenes de células de levadura vistas a través de un microscopio a diferentes aumentos.

La mayoría de las levaduras tienen un ciclo de reproducción asexual por gemación. Algunas tienen una reproducción asexual por fisión binaria. Cuando la célula se separa de la madre, deja una cicatriz. Las gemas se pueden hacer en un determinado polo o a lo largo de toda la superficie. Algunas levaduras tienen gemación unipolar o siempre geman sólo por un polo.

Es muy característico de *Malassezia pachydermatis* que es un agente etiológico de otitis en perros y dermatitis crónica en gato y perro. Tiene como característica que tiene una base muy amplia. Otras levaduras pueden dividirse bipolares o multipolares. Algunas levaduras no separan la célula hija (gema o blastospora o blastoconidio) y forman pseudomicelio. La célula hija va unida y se va alargando. Es importante saber si puede o no formar pseudomicelio para clasificar una levadura. La prueba de filamentación va muy ligada a la identificación de *Candida albicans*, porque sólo ella da positiva. A partir de una muestra aislada, la levadura se siembra en un tubo con 1 ml de suero bovino.

Se incuba a 37°C durante 3-4 horas y después se hace una preparación microscópica y se mira. Si es positiva, algunas levaduras producen 1 tubo de germinación o sedimentación. Crecen más rápido que los hongos miceliares pero hace falta 48 horas como mínimo.

b) Características de reproducción sexual.

Hay dos células A ya que se multiplican por gemación y siguen su ciclo asexual. Si se encuentran y son compatibles, inician una reproducción sexual o plasmogamia o cariogamia y dan una célula diploide. Puede haber células haploides y diploides gemando. Después se dividen meióticamente y dan células haploides que son genéticamente diferentes. En un momento determinado, si se encuentran, inician un ciclo sexual.

c) Características fisiológicas y bioquímicas.

Son pruebas que tardan 24-48 horas y que muchas son parecidas a las de las bacterias.

- Crecen a 32°C.
- Resistencia a actidiona o ciclohexidina.
- Fermentación de carbohidratos.
- Pruebas de asimilación de carbohidratos.
- Están muy estandarizadas las pruebas de asimilación.
- Sólo sirven para identificar algunas levaduras de interés clínico.

3.6 *Candida utilis*.

3.6.1 Generalidades. ⁽¹⁸⁾

Si bien la levadura de cervecería y destilería suele ser ***Saccharomyces cerevisiae***, la levadura propagada específicamente para alimentación de los animales es, en general, la ***Torulopsis utilis***, conocida también como levadura de tórula o levadura forrajera (figura N° 8). La levadura de tórula se emplea porque crece rápidamente y puede cultivarse sobre una gran diversidad de materiales. Entre los materiales que se emplean como sustrato para la producción de levadura forrajera figuran el licor de prensa, obtenido de la fabricación de la pulpa de citrus desecada; melaza; licor residual de sulfito de la industria papelera; madera sacarificada (tanto hexosas como pentosas), y residuos de frutos (granos de café, manzanas, etc.). La levadura de tórula crece mejor con un pH 4. El nitrógeno y el fósforo tienen que añadirse al medio de cultivo: alrededor de 0,4 kg de sulfato amónico y 0,13 kg de fosfato trisódico por cada kg de levadura producida. Para fomentar el rápido crecimiento de la levadura y reducir al mínimo la producción de alcohol, hay que proporcionar aire en abundancia. El aire se introduce por el fondo del fermentador y se dispersa mediante un propulsor o mediante un disco de cerámica porosa.



Figura N° 8: Imagen de la *Cándida utilis* vista a través de un microscopio electrónico.

3.6.2 Clasificación. ⁽¹⁾

Según Lodder J. (1970) y Frazier W.C. (1976).

- Nombre científico : ***Cándida utilis***
- División : ***Hongos***
- Filum : ***Eumicetos***
- Clase : ***Deutoromicetos***
- Orden : ***Criptococales***
- Familia : ***Criptococaceas***
- Sub-familia : ***Criptococoideas***
- Genero : ***Cándida***
- Especie : ***Utilis***

3.6.3 Sinónimos. ⁽¹⁾

Torula utilis, Torulopsis utilis, Cryptococcus utilis, Cándida guillermondi.

3.6.4 Usos. ⁽¹⁸⁾

La levadura desecada es valiosa como fuente de proteína de gran calidad y no tiene el sabor amargo de la levadura de cervecería que, sin embargo, suele tener mayor valor biológico. La levadura forrajera tiene abundantes minerales y vitaminas B y, si se irradia, aporta también vitamina D. La levadura desecada puede incluirse en piensos mixtos para toda clase de ganado. Normalmente, el costo elevado limita su empleo y la inclusión de levadura en las raciones se basa principalmente en su valor como suplemento para suplir las deficiencias de aminoácidos y vitaminas de los cereales. La levadura es rica en purinas (8%) y en piridinas (4%). Estas sustancias no tienen prácticamente ningún valor nutritivo y se incluyen en la fracción de proteína bruta en el análisis cuantitativo. Cuando el costo de la levadura desecada es bajo, puede suministrarse a los bovinos, como fuente de proteína, en cantidades de 1-2 kg diarios.

Se ha informado que las vacas de gran producción lechera rinden más aún cuando se alimentan con levadura, lo que puede deberse a que la propia producción de vitaminas B del animal no basta para un elevado rendimiento lechero. Para los terneros, las vitaminas B de la levadura tienen valor y, por consiguiente, algunas veces se incluyen a razón de 3-5% en las raciones de partida para terneros, así como en los piensos para los terneros en crecimiento. Los cerdos toleran bien hasta un 5% de levadura en la ración total. Algunas veces, cuando se cuenta con otras fuentes más baratas de vitaminas y de

proteínas, se añaden pequeñas cantidades de levadura para aportar factores de crecimiento no identificados.

Se ha informado que cuando se suministra levadura a las cerdas durante la gestación y lactación (100-400 g al día), mejora el crecimiento de los lechones, y hay una menor mortalidad. La levadura puede sustituir al aceite de soja, en igualdad de peso, en las raciones de las aves de corral hasta un total del 9% de la ración para pollos, y, por lo menos, un 23% para las hembras. Para obtener resultados óptimos, se deben emplear cantidades mucho menores, alrededor de 3g diarios por ave. Hay que hacer una distinción entre la levadura desecada corriente y la extraída en la producción de extracto de levadura, ya que esta última sólo contiene la mitad de proteína que la primera, y es pobre en vitaminas.

3.7 Utilización de residuos agroindustriales como sustrato para microorganismos. ⁽¹⁾

Para que los microorganismos sean una fuente de vitaminas que contribuyan a aliviar los problemas de mala nutrición, su producción debe ser abundante y barata. De ahí que los residuos agroindustriales que contienen azúcares (melaza, agua de maíz, desechos de la industrialización de la piña y otras frutas, etc...) puede constituir una fuente ideal para la producción microbiológica de vitaminas. En el proceso de industrialización agrícola, se genera una alta cantidad de residuos, entre los que se encuentran las melazas de caña de

azúcar, pulpa de henequén, subproductos de papa, agua de cocimiento de maíz, semillas de algodón, cáscaras de diversas frutas, etc. Al provenir de fuentes renovables, se facilita su utilización para la obtención de materias primas que pueden ser utilizadas en la industria química, farmacéutica y alimentaria.

Muchos de estos residuos tienen utilidad práctica como fuente de nitrógeno, carbono y/o de factores de crecimiento, en procesos de producción de muchas sustancias. El desarrollo de procesos que permitan la utilización de residuos agroindustriales, permitiría al mismo tiempo la eliminación controlada de los mismos de una manera efectiva e inocua. Estos procesos de utilización de residuos agroindustriales, además de contribuir al cuidado del medio ambiente, crean nuevas fuentes de riqueza que aportan una mayor rentabilidad a los procesos industriales.

3.8 La planta de piña. ^(2, 4)

3.8.1 Generalidades.

La piña es una planta del trópico americano y más específicamente de Sur América, se conoce científicamente con los nombres de **Ananas sativa**, **Ananas comosa** y **Bromelia ananas**. Es una planta herbácea, vivaz hasta los cuatro años. Su tallo central y único alcanza hasta 1.20 metros de altura, según la variedad y el terreno donde se coseche.

3.8.2 Características de cultivo.

Se cultiva con verdadero provecho en las zonas tropicales y subtropicales, en terrenos arcillosos y limosos y con buen desagüe. El tipo de suelos para su mejor desarrollo es el franco, debido a su sistema radicular denso y débil con un pH entre 5 y 5.5. Necesita una altura sobre el nivel del mar no superior a los 800 metros, con temperatura media entre 25°C y 26°C y mínima de 13°C, y precipitación pluvial entre 1000 mm y 1500 mm anuales, sin largos periodos de sequía. La siembra se efectúa entre agosto y diciembre, y tarda en fructificar de 18 a 20 meses, según las condiciones ecológicas y el método de cultivo. A nivel comercial se recomienda la propagación por retoños y por vástagos, ya que su producción es más precoz, sin embargo no existen en abundancia, recurriendo a emplear los tallos de las plantas.

3.8.3 Frutos.

La piña es una fruta compuesta, esto es, está constituida por una colección de pequeñas frutas llamadas frutillas. Cada una de esas frutillas nace separadamente sobre el pedúnculo, y a consecuencia de un proceso evolutivo se fusionan y forman así la fruta compuesta. Para el corte del fruto se aconseja realizarlo cuando no ha alcanzado el color típico de su completa madurez, debe cortarse cuando inicia el cambio de coloración, evitando así sufrir un deterioro durante el manejo posterior a la cosecha.

3.8.4 Usos e Importancia.

El cultivo de la piña tiene varios usos, ya que además de su consumo fresco pueden prepararse jugos, mermeladas, vinos, encurtidos y frutas deshidratadas. Además los desperdicios como la cáscara, corona, tallos y corazón, también pueden ser utilizados para diversos fines, tales como alimento para ganado, en la industria del papel y como sustrato para procesos microbiológicos, entre otros (Anexo N° 3). Su importancia desde el punto de vista nutricional es considerado por su contenido vitamínico, el cual se muestra en la tabla N° 2, junto con otros componentes.

TABLA N° 2: COMPOSICIÓN QUÍMICA EN 100G DE JUGO.

Calorías	49.0 cal/g	Sodio	0.5 mg
Agua	86.2 %	Cobre	0.04 mg
Carbohidratos	14.0 %	Vitamina A	80.0 IU
Azúcares totales invertidos	13.8 %	Vitamina C	9.0 mg
Acidez (ac. Cítrico)	0.6 %	Vitamina B ₆	0.76 mg
Cenizas	0.4 %	Vitamina B ₁	0.05 mg
Proteínas	0.3 %	Vitamina B ₂	0.02 mg
Grasas	0.1 %	Ac. Nicotínico	0.2 mg
Fibra	0.1 %	Ac. Fólico	0.001 mg
Potasio	140.0 mg	Oxalatos	6.3 mg
Calcio	15.0 mg	% de Azúcares:	
Magnesio	12 mg	Sacarosa	66%
Fósforo	8.0 mg	Glucosa	17%
Manganeso	0.6 mg	Fructosa	17%
Hierro	0.6 mg		

3.8.5 Variedades.

Se consideran más de 100 variedades de piña. Entre las variedades más importantes a nivel nacional recomendadas por el CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal) están las variedades siguientes: Azucarón, Cayena Lisa, Castilla, Agua y Java.

3.8.6 Madurez fisiológica.

Las diferentes etapas de desarrollo de un fruto son: sazónamiento, maduración y senescencia. Estos nombres fueron asignados en base a una serie de cambios físicos y bioquímicos ocurridos en tiempos específicos durante el desarrollo de la fruta. El conocimiento de los cambios que normalmente ocurren en la piña es de gran importancia, ya que nos permite saber el estado de madurez adecuado en que debe ser cosechada.

En la práctica, determinar el estado de madurez en base a los cambios bioquímicos sucedidos en el fruto resulta laborioso e impracticable. Para esta finalidad se han establecido escalas comerciales que facilitan la identificación del estado de madurez basados simplemente en la coloración de la cáscara. Se considera que una piña está madura cuando el 100% de la cáscara es amarilla.

3.8.7 Cambios composicionales durante el desarrollo.

- Carbohidratos solubles.

La mayor parte de los carbohidratos solubles de la piña son disacáridos (sacarosa) y monosacáridos (glucosa y fructosa). De la presencia de estos depende parte del sabor del fruto, que es un factor importante para su aceptación o rechazo. Durante el período de maduración de la fruta la cantidad de sacarosa presenta un máximo de concentración y posteriormente declina. Lo contrario ocurre con los azúcares reductores directos y totales, los cuales continúan su incremento durante todas las etapas de desarrollo de la fruta. El mayor incremento se observa cuando la concentración de sacarosa disminuye, lo cual indica que el aumento en la cantidad de azúcares reductores viene en parte de la hidrólisis de la sacarosa, y por otro lado, debido a los que se generan durante el proceso de fotosíntesis.

- Ácidos.

Los ácidos de mayor importancia en la piña, basado en su concentración son el cítrico y el málico. De estos, el primero aporta alrededor del 80% de la acidez total. Durante la poscosecha la acidez titulable exhibe un leve aumento, pero posteriormente tiende a bajar hasta llegar ligeramente arriba de su punto inicial.

- Pigmentos.

El proceso de maduración de la piña esta asociado con una disminución en la concentración de clorofila en la cáscara. En la pulpa, los carotenoides pasan de una concentración mínima a los 40 días antes de la etapa conocida como maduración, a una concentración máxima en el punto en que la fruta esta completamente madura. Posteriormente el proceso continua pero con mayor lentitud.

- Otros componentes.

En la última etapa de maduración del fruto se producen ésteres y compuestos volátiles como acetaldehído, acetato de etilo, acetona, etanol, propionato de etilo, etc. Los compuestos nitrogenados varían con el estado de desarrollo de la fruta; los principales constituyentes son complejos enzimáticos tales como la bromelina. Sin embargo, no se considera que las sustancias peptídicas contribuyan considerablemente con la calidad de la fruta.

3.9 Cinética de crecimiento microbiano. ⁽¹⁾

La microbiología comprende el estudio de una amplia variedad de sistemas vivientes "inferiores" que incluyen virus, bacterias, algas, hongos simples como las levaduras y los mohos, así como los hongos superiores altamente diferenciados más grandes como las setas.

En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último, se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación. De hecho, una célula microbiana no viable se define como aquella que incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un periodo suficientemente largo, es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse, una célula que aparentemente no crece, aun puede ser viable, pero el medio es incapaz de apoyar el crecimiento debido a la disminución de un nutriente esencial, la presencia o producción de materiales tóxicos o un cambio en el medio físico, como la disminución de oxígeno, pH o temperatura. A menudo las células pueden vivir en este estado sin crecimiento, particularmente como esporas o quistes, por periodos largos.

Las células microbianas requieren de un alto grado de adaptabilidad para responder a cambios tanto en el medio físico como en el químico. A diferencia de las formas de vida diferenciadas multicelulares, los organismos unicelulares responden a cambios en el medio al exhibir un conjunto diferente de actividades metabólicas. Los organismos unicelulares son capaces de existir en una variedad de estados fisiológicos y pueden cambiar rápidamente de un estado a otro. El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de

crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en sistemas cerrados, como el cultivo intermitente, y en sistemas abiertos, como el cultivo alimentado por lotes y el cultivo continuo.

3.9.1 Medición del crecimiento microbiano. ⁽¹⁾

Existen varios métodos para medir el crecimiento de células microbianas, entre los cuales tenemos: Peso seco celular, absorción, peso húmedo, volúmen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular, etc.

- Peso seco celular.

El método mas usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como levaduras, esto usualmente implica centrifugación (4.6×10^3 rpm). Luego las células concentradas se colocan en una estufa a 90°C o a 105°C hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas, generalmente se expresa en términos de g/l. En las determinaciones de peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrífuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso medido.

- Absorción.

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro esta relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la **Ley de Beer**. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de estas cambian durante el crecimiento del cultivo.

- Peso húmedo.

Es simplemente la centrifugación o filtración del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento, ya que se mide el agua tanto extracelular como intracelular, lo cual puede causar errores considerables.

- Volumen de células empacadas.

Mediante la centrifugación de muestras de cultivo en tubos de centrifuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas. Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

- Número de células.

El crecimiento se puede determinar también en términos de número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos de microscopios graduados como los de Herber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio. Aunque este método es relativamente rápido y exacto, no distingue entre células viables y no viables, también es muy agotador; sin embargo, se cuenta con contadores de células automáticos.

- Masa de un componente celular.

En los casos donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y ATP celulares. Pueden surgir dificultades, ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de este son diferentes.

- Mediciones físicas.

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Se ha demostrado que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración de biomasa. Este método es

directo, no requiere de muestreo y es instantáneo, pero es más adecuado para biorreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser adecuada.

Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado que está directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaeróbicos.

3.9.2 Cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes. ^(1, 8)

El conocimiento y la cinética de producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades, y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso.

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la modalidad de cultivo entre las que distinguimos el cultivo por lotes y el cultivo por lotes alimentados o semicontinuo.

El cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua.

En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables, que produce una serie de eventos característicos denominada curva de crecimiento, la cual se representa por una gráfica del peso seco celular (g) o biomasa (g/l), contra el tiempo de incubación en horas (h), tal como se muestra en la figura N° 9.

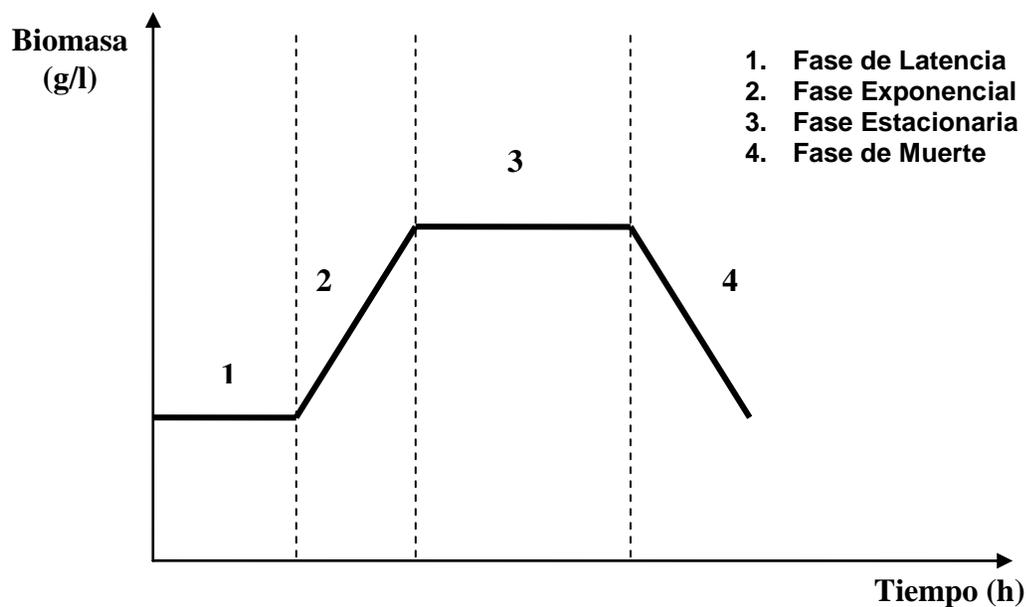


Figura N° 9: Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes.

- 1- **Fase de latencia:** Se produce inmediatamente después de la inoculación. En ella no hay iniciación de replicación de ADN ni separación de nuevas células. Se produce el reacomodo de la composición macromolecular al nuevo ambiente en que se encuentran las células inoculadas.
- 2- **Fase de crecimiento exponencial o logarítmico:** Las células se reproducen a una velocidad que es la máxima de todas las fases de crecimiento, los nutrientes se consumen constantemente.
- 3- **Fase estacionaria:** Se caracteriza por ningún crecimiento neto. De hecho el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular. Se alcanza cuando se agota un nutriente, razón por la cual se detiene el crecimiento.
- 4- **Fase de muerte:** Durante la fase estacionaria la rapidez de desaparición (muerte) se vuelve más alta que la rapidez de crecimiento, en cuyo caso disminuye la densidad celular. Esta fase se presenta en aquellos cultivos en los que se inducen enzimas autolíticas en condiciones de inanición.

3.9.3 Evaluación de la cinética de crecimiento microbiano. ⁽⁸⁾

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes implica la medición del crecimiento de los microorganismos, consumo de nutrientes y formación de productos.

3.9.3.1 Crecimiento de microorganismos.

- Rapidez Específica de crecimiento.

Se define como la rapidez de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y describe el crecimiento en cualquier etapa durante el ciclo de este.

$$\mu = d(\ln X)/dt$$

Donde:

μ = Rapidez específica de crecimiento (h^{-1}).

X = Biomasa (g/L).

t = Tiempo (h).

3.9.3.2 Consumo de nutrientes (utilización de sustrato).

- Rapidez volumétrica de consumo de sustrato.

Describe los gramos de sustrato que se consumen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo.

$$QS = - \frac{ds}{dt}$$

Donde:

QS = Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h).

S = Concentración de azúcares totales (g/L).

t = Tiempo (h)

- Rapidez específica de consumo de sustrato.

Describe la rapidez de consumo de sustrato por gramos de biomasa en la unidad de tiempo.

$$q_s = - \frac{1}{x} \cdot \frac{ds}{dt}$$

Donde:

qs = Rapidez específica de consumo de sustrato (g/g.h).

S = Concentración de azúcares totales (g/L).

t = Tiempo en (h).

X = Biomasa (g/L).

6.9.3.3 Formación de productos.

- Rapidez volumétrica de formación de productos.

Describe los gramos de producto que se producen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo.

$$QP = \frac{dp}{dt}$$

Donde:

QP: Rapidez Volumétrica de formación de producto (g/L.h).

p = Producto formado (g/L).

t = Tiempo (h).

- Rapidez específica de formación de producto.

Relaciona la rapidez de síntesis del producto con la concentración de biomasa.

$$q_p = \frac{1}{x} \cdot \frac{dp}{dt}$$

Donde:

q_p: Rapidez específica de formación de productos (g/g.h).

x = Biomasa (g/L).

p = Producto formado (g/L).

t = Tiempo (h).

3.9.3.4 Rendimiento en el cultivo.

- Coeficiente de rendimiento de Biomasa.

Representa la biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido.

$$Y_{x/s} = - dx/ds$$

Donde:

Y_{x/s}: Coeficiente de rendimiento de Biomasa (g/g).

x = Biomasa (g/L).

s = Concentración de azúcares totales (g/L).

- Coeficiente de rendimiento de producto.

Representa el producto formado por cada gramo de sustrato consumido.

$$Y_{p/s} = - dp/ds$$

Donde:

$Y_{p/s}$: Coeficiente de rendimiento de producto (g/g).

s = Concentración de azúcares totales (g/L).

p = Producto formado (g/L).

3.10 Idealización y modelado matemático de sistemas naturales. (15, 16, 19)

El aplicar leyes científicas básicas para describir fenómenos concretos requiere de idealizaciones, esto se debe a las condiciones cambiantes en las que los fenómenos naturales ocurren y a la necesidad de la reducción en los grados de libertad de los sistemas para modelarlos (menor cantidad de variables presentes en el modelo). La idealización provoca modelos mucho más simples que el fenómeno original, pero a su vez los modelos simplificados son más rápidos y fáciles de manejar, ya que si se desea abrazar una gran cantidad de detalles en el mismo, representados por parámetros y variables, lo que se logra en realidad es inhibir el uso del modelo; por tal motivo resulta apropiado hacer aproximaciones que impliquen reducción sensible en la complejidad del mismo, ya que la simplicidad robustece su diseño.

Podemos considerar tres tipos de modelo, que a su vez se corresponde a diferentes niveles de modelación:

1. **Los diagramáticos**, llamados así porque generalmente implican diagramas, gráficas o esquemas, auxilian en la representación causal del fenómeno en cuestión.
2. **Los matemáticos**, se concentran en una descripción matemática del comportamiento o dinámica del fenómeno físico, el cual es representado en términos de ciertos parámetros físicos relevantes, y un conjunto de leyes físicas formuladas matemáticamente que relacionan a esos parámetros.
3. **Los experimentales**, construir este tipo de modelo requiere del entendimiento de cómo otros fenómenos físicos le afectan al fenómeno en cuestión dentro de un artefacto tecnológico y para ellos se representan sus relaciones en términos de parámetros físicos relevantes que pueden ser medidos y manipulados en experimentos, y nos auxilia para examinar capacidades y causas estructurales.

3.10.1 Herramientas del modelado.

El proceso de idealización que el diseño en ingeniería implica, no consiste simplemente en derivar soluciones de las leyes ideales en condiciones específicas, sino que requiere adicionalmente de elementos no teóricos, tales como las correcciones, normalizaciones y los ajustes, entre otros. Y en este caso no existen reglas generales conocidas que provengan de la teoría.

La iniciación en el modelado, según Khun, proviene de las habilidades adquiridas en la vida de estudiante al resolver problemas y estudiar los fenómenos más representativos. En contraparte, describir el comportamiento de un sistema mediante la modelación matemática requiere como herramientas básicas a la abstracción y la idealización, de tal manera que pueden existir infinidad de modelos para el mismo fenómeno esencialmente diferentes, dependiendo de los requerimientos establecidos por el diseñador y de las decisiones que toma durante el proceso de diseño. Así, el problema más difícil de la investigación es “¿Cómo trasladar un fenómeno físico a un conjunto de ecuaciones que lo describan?, ya que “usualmente resulta imposible describir al fenómeno totalmente, más bien nos conformamos con hacerlo aproximada y adecuadamente”. Ducheyne, en su análisis sobre el estilo de Newton en la modelación, afirma que era esencialmente reduccionista y que consiste de tres fases:

Inicia asumiendo entidades y condiciones físicas más simples que aquellas que se estudian en la naturaleza; por ejemplo: puntos masa, cuerpos rígidos, sistemas de un solo cuerpo, fuerzas constantes a pesar de las pequeñas variaciones que se pueden manifestar, etc. Estas ideas abstractas se construyen como análogos al sistema natural, y son términos matemáticos que no se encuentran en el dominio de la matemática pura, ya que son derivados de las condiciones físicas. Esta fase de idealización integra un amplio rango de

ingredientes, tales como analogías, metáforas, nociones teóricas, conceptos y técnicas matemáticas, estilos personales e incluso políticas.

La segunda fase consiste en la búsqueda de relaciones entre las entidades y la transferencia de los resultados obtenidos matemáticamente a la naturaleza, esto es, que la información obtenida matemáticamente debe de compararse y contrastarse con los datos experimentales y las observaciones. Al realizar esta contrastación, y para reducir las diferencias entre modelo y sistema estudiado, Newton avanzaba incrementalmente a modelos más complejos, una vez que el grado de aproximación deseado ocurre, la investigación se mueve a la fase tres.

En la tercera fase estos principios ya no serán puramente matemáticos pero serán aplicados al mundo real de naturaleza física revelados por experimentos y observaciones en los cuales se varían las condiciones iniciales. Las condiciones y entidades matemáticas ya no serán simplificadas o idealizadas, o imaginadas como constructos matemáticos pero serán más parecidas (no idénticas) a las condiciones del mundo externo. Este proceso de aproximación concluye cuando el conjunto de datos generados por las ecuaciones se compara contra los datos obtenidos del sistema y resultan ser consistentes (cercaños), con ello se gana confianza en el modelo (no seguridad); por el contrario, si los datos generados por el modelo no son cercaños a los datos del sistema, las ecuaciones se deben de corregir. Las cantidades y variables que se asumen en el primer paso deben de ser claramente descritas y deben incluir

las relaciones entre las cantidades a estudiar. Así de esas relaciones se deben de derivar las ecuaciones que relacionan a las variables y los parámetros.

3.10.2 Consideraciones al modelar un sistema.

Al modelar un sistema o proceso natural se debe tomar en cuenta que:

- El objetivo del modelado es lograr una representación que sea fácil de usar y consiste en la descripción de un sistema en una forma matemáticamente consistente.
- Un modelo es una entidad que media entre la teoría (la explicación del comportamiento) y el mundo (los hechos) y se construyen (los modelos) expresos para resolver una situación problema.
- En particular los modelos abstractos (o conceptuales) corresponden a “construcciones teóricas que representan procesos físicos, biológicos o sociales, con un conjunto de variables y un conjunto de relaciones lógicas y cuantitativas entre ellas.
- El modelo de un fenómeno es una herramienta que se usa para describirlo, interpretarlo, predecir comportamiento en diferentes situaciones específicas, validar hipótesis y elaborar estrategias para la intervención.
- La utilidad de los modelos es representar el comportamiento ideal de los procesos para servir de patrón comparativo ante diferentes situaciones específicas y por tanto permiten no sólo describir al fenómeno en consideración, sino también descubrir o demostrar la existencia de

fenómenos nuevos y proveer de un medio retórico y de marco de referencia para la discusión científica.

- Los modelos son empleados como medio de predicción de la manifestación cuantitativa o cualitativa de un fenómeno en regiones no exploradas y contiguas a la zona conocida; predicción que posteriormente puede ser validada o verificada mediante la toma de datos en dicha zona, acción que le da el carácter de uso experimental al propio modelo predictor y por tanto lo convierte en herramienta básica del método científico.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio.

La presente investigación fue de carácter prospectivo, experimental y exploratorio, ya que se realizaron estudios de laboratorio para evaluar y definir el comportamiento de la cinética del proceso de producción de riboflavina por la acción metabólica de la *Candida utilis* en el jugo de cáscara de piña (*Ananas comosus*), de manera que los resultados obtenidos en dicha investigación servirán de base para futuras investigaciones acerca del tema.

La investigación se llevó a cabo en tres etapas: Investigación bibliográfica, investigación de campo y parte experimental.

4.2 Investigación bibliográfica.

- Biblioteca " Dr. Benjamín Orozco", Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Bibliografía disponible en "Corporación Bonima S.A. de C.V."
- Centro de Información Económica y Social (CIES). Ministerio de Economía.
- INTERNET.

4.3 Investigación de campo.

Se realizó un muestreo puntual dirigido a la obtención de la cáscara de piña, la cual fue procesada para ser utilizada como medio de producción y cultivo. Dicho

muestreo se realizó en el mercado central de zacatecoluca. La piña muestreada cumple con las siguientes características (Anexo N° 4; Figura N° 121):

- Variedad de azucarón (***Ananas comosus***).
- En estado de maduración.
- Fruto reblandecido.
- Fruto color amarillo.

4.4 Parte experimental.

4.4.1 Obtención del jugo de cáscara de piña (Anexo N° 5).^(2,4)

- Lavar bien la piña con agua y jabón.
- Enjuagar bien con agua para quitar los restos de jabón.
- Secar con una toalla limpia y seca.
- Retirar la cáscara de la piña con un cuchillo.
- Recolectar la cáscara en un recipiente limpio (Anexo N° 4; Figura N° 122).
- Cortar la cáscara de piña recolectada en trozos pequeños.
- Triturar pequeñas cantidades de cáscara de piña en una licuadora y adicionar agua destilada en porciones (Anexo N° 4; Figura N° 123), de manera que se obtenga un líquido de consistencia espesa, recolectar líquido.
- Continuar procesamiento de la cáscara hasta utilizar aproximadamente 2.60 Kg de cáscara de piña y 4.20 Litros de agua destilada.

- Filtrar el líquido obtenido con gasas y recibir el filtrado en un recipiente limpio y seco (Anexo N° 4; Figura N° 124).
- Guardar el filtrado en refrigeración y reposar por 24 horas, de manera que los residuos sólidos sedimenten.
- Filtrar el líquido en frío y al vacío haciendo uso de papel filtro de flujo rápido, hasta obtener un líquido libre de residuos sólidos.
- Recolectar el jugo de cáscara de piña libre de sólidos. El jugo preparado de esta forma rinde para aproximadamente 4.96 L de medio de producción.

4.4.2 Preparación del biorreactor. ⁽¹⁾

- Lavar con agua y jabón un kitazato de 1000 mL (biorreactor).
- Enjuagar con agua hirviendo y secar con una toalla limpia y seca.
- Limpiar las paredes internas con alcohol isopropílico. Dejar evaporar el alcohol.
- Enjuagar con agua destilada estéril para eliminar los restos del alcohol isopropílico.
- Dejar escurrir hasta que esté completamente seco.
- Autoclavar a 121°C por 20 minutos.

4.4.3 Preparación de la fuente de oxígeno. ⁽¹⁾

- Lavar con agua y jabón la bomba de oxígeno.
- Enjuagar con agua hirviendo.

- Limpiar con alcohol isopropílico y dejar evaporar el alcohol.
- Lavar con agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol isopropílico. Dejar escurrir hasta que este completamente seca.

4.4.4 Preparación del medio de producción (Anexo N° 6). ^(1,6)

- Incorporar 950 mL de jugo de cáscara de piña en un erlenmeyer de 1000 ml, e incorporar aditivos según corresponda (0.2 g/L de fosfato trisódico, 5.0 g/L de sulfato de amonio, sacarosa 1.0%) previamente disueltos en 50 mL de jugo de cáscara de piña. Agitar y homogenizar.
- Tomar el pH del medio de producción utilizando un pHmetro y llevar a pH 4 utilizando ácido clorhídrico 1 N o hidróxido de sodio 1 N según sea necesario.
- Esterilizar en autoclave el medio de producción a 121°C por 20 minutos.
- Tomar una muestra de 50 ml del medio de producción y colocarla en un erlenmeyer de 250 ml. Esta muestra se utilizará para determinar los parámetros iniciales del proceso (muestra control). Almacenar la muestra control en refrigeración.

4.4.5 Preparación del inóculo (Anexo N° 7). ^(1,4)

El microorganismo utilizado fue la *Candida utilis* YP900, se utilizaron las cepas correspondientes a la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

- Asegurar el estado puro de la cepa realizando un cultivo en 3 cajas de petri conteniendo agar Saboraud - Dextrosa, inoculando por el método del estriado. Incubar por 3 días a temperatura ambiente y observar la morfología de las colonias (Anexo N° 4; Figura N° 125).
- Con un asa de inoculación tomar una muestra de las colonias desarrolladas en la caja de petri y realizar una preparación fresca (frotis) para ser vista al microscopio. Observar la morfología de las células de levadura.
- Una vez asegurado el estado puro de la levadura, tomar un inóculo de las colonias de levadura desarrolladas en la caja de petri e inocular sobre 5 tubos que contengan agar inclinado Saboraud - Dextrosa por el método del estriado. Incubar a temperatura ambiente por 24 horas (Anexo N° 4; Figura N° 126).
- Inocular la levadura desarrollada en cada uno de los 5 tubos con agar inclinado saboraud - Dextrosa en 150 ml de jugo de cáscara de piña estéril (preparado según se indica en 2.4.4), contenidos en un kitazato de 250 ml. Homogenizar y recubrir el kitazato con papel carbón.
- Incubar con oxigenación constante y a temperatura ambiente por 72 horas (Anexo N° 4; Figura N° 127).

4.4.6 Técnica de producción (Anexo N° 8). (1,4)

- Incorporar 800 mL de medio de producción esterilizado al biorreactor (kitazato de 1000 mL) y adicionar el inóculo. Agitar y homogenizar.

- Tomar una muestra de 100 mL en un erlenmeyer de 250 mL, recubrir con papel carbón y almacenar en refrigeración (muestra cero horas).
- Recubrir el biorreactor con papel carbón e incubar a temperatura ambiente con agitación constante y aireación durante 7 días (Anexo N° 4; Figura N° 128).
- Tomar muestras cada 24 horas durante los 7 días del proceso fermentativo. Almacenar las muestras en refrigeración para su posterior análisis.

4.4.7 Determinación de biomasa por el método de peso seco (Anexo N° 9). ⁽¹⁾

- Secar un tubo de ensayo con tapón en rosca a una temperatura de 105°C por 30 minutos.
- Enfriar el tubo en un desecador por 15 minutos y pesar en una balanza analítica (tara).
- Con una pipeta de mohr estéril tomar una alícuota de 10 mL de las muestras recolectadas durante el proceso de producción.
- Adicionar la alícuota de 10 mL de muestra al tubo de ensayo con tapón en rosca previamente tarado, tapar el tubo y centrifugar por 15 minutos (Anexo N° 4; Figura N° 129).
- Decantar y almacenar el líquido sobrenadante.
- Secar tubo con biomasa sedimentada a 105°C por 2 horas (sequedad/peso constante).

- Enfriar en un desecador por 15 minutos y pesar el tubo con la muestra seca en una balanza analítica. Determinar la biomasa por diferencia de peso.

4.4.8 Determinación de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico (Anexo N° 10). ⁽⁶⁾

Deproteinización de las muestras de fermentación.

- Con una pipeta de mohr estéril de 1.0 ml, tomar una alícuota de 0.5 mL del líquido previamente filtrado obtenido en la determinación de biomasa por peso seco.
- Colocar la alícuota en un tubo de ensayo y adicionar 4.5 mL de agua destilada (dilución 1/10).
- Adicionar al tubo de ensayo 0.5 ml de una solución de sulfato de zinc al 10% y 0.5ml de Hidróxido de sodio 0.5 N, utilizando para ello pipetas de mohr de 1 ml. Mantener en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos y tomar una alícuota de 0.5 ml del sobrenadante obtenido, colocar la alícuota en un tubo de ensayo.

Tratamiento de las muestras deproteinizadas.

- Utilizando una pipeta mohr de 2 ml, adicionar 1.5 ml de agua destilada al tubo de ensayo que contiene la alícuota de sobrenadante.

- Utilizando una pipeta mohr de 1 ml, adicionar 0.1 ml de fenol al 80%, sumergir los tubos en un baño de agua fría y adicionar lentamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado utilizando una pipeta volumétrica de 5 ml.
- Agitar y mantener en reposo los tubos durante 30 minutos exactos, manteniéndolos a temperatura ambiente (Anexo N° 4; Figura N° 130).
- Leer las muestras tratadas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.
- Cuantificar la cantidad de azúcares totales en las muestras interpolando las absorbancias obtenidas en una curva estándar de sacarosa previamente elaborada.

Elaboración de la curva estándar de sacarosa (Anexo N° 11).

- Pesar 10 mg de sacarosa grado reactivo en una balanza analítica.
- Colocar los 10 mg de sacarosa en un balón volumétrico de 100 ml.
- Adicionar al balón de 100 ml, 30 ml de agua destilada y agitar hasta su completa disolución.
- Aforar con agua destilada, obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml de sacarosa.
- Preparar a partir de la solución de 100 µg/ml de sacarosa, las soluciones que se detallan en la tabla N° 3.

TABLA Nº 3: ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE SACAROSA.

Tubo	Solución de Sacarosa (ml)	Agua Destilada (ml)	Fenol 80% (ml)	Acido Sulfúrico concentrado (ml)
1	0.0	2.0	0.1	5.0
2	0.1	1.9	0.1	5.0
3	0.2	1.8	0.1	5.0
4	0.4	1.6	0.1	5.0
5	0.6	1.4	0.1	5.0
6	0.8	1.2	0.1	5.0
7	1.0	1.0	0.1	5.0

- Leer las soluciones en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm y elaborar una curva de absorbancia versus concentración de sacarosa.

4.4.9 Determinación de pH.

Haciendo uso de un pHmetro, tomar el pH a 20 mL de muestra previamente filtrada al vacío con papel filtro de flujo rápido.

4.4.10 Identificación de la riboflavina. (7, 9, 12)

- En tres tubos de ensayo adicionar respectivamente 10 mL de muestra previamente filtrada, 10 mL de solución estándar de riboflavina y 10 mL de agua destilada (blanco).
- Introducir los tubos en una cámara provista con una lámpara de luz ultravioleta.

- Muestra y solución estándar deben presentar un intenso color verde amarillento fluorescente al ser iluminados con luz ultravioleta (Anexo N° 4; Figura N° 131).

4.4.11 Determinación espectrofotométrica de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio (Anexo 12). (7, 9, 12)

Preparación de la solución estándar (15 µg/ml).

- Pesar 0.5 g de estándar de riboflavina y colocarlo en una capsula de porcelana.
- Secar en estufa a 105°C por 2 horas y dejar enfriar en un desecador por 15 minutos.
- Pesar 0.0075 g de estándar de riboflavina previamente secado e incorporarlo a un balón volumétrico de 500 ml.
- Adicionar 400 ml de ácido acético glacial diluido (1:400) y disolver con calentamiento suave en baño de María y con agitación constante.
- Aforar con agua destilada y homogenizar.
- Cubrir el balón volumétrico con papel carbón y almacenar en refrigeración.

Procedimiento.

- Tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 5.0 ml de la muestra previamente filtrada (Anexo N° 4; Figura N° 132) y 5.0 ml de la solución estándar, transferir cada alícuota a un tubo colorimétrico limpio y seco.

- Medir la absorbancia de la muestra y la solución estándar a una longitud de onda de 445 nm usando agua como blanco.
- Adicionar 0.02 g de hidrosulfito de sodio a muestra y solución estándar, agitar bien y medir nuevamente la absorbancia.
- Encontrar la concentración de riboflavina en la muestra utilizando la siguiente formula:

$$\text{Concentración riboflavina} = \text{Cst} \times \frac{\text{AT} - \text{AT}'}{\text{AS} - \text{AS}'} \quad (7, 12)$$

Donde:

Cst = Concentración estándar de riboflavina ($\mu\text{g/mL}$).

AT = Absorbancia de la muestra sin hidrosulfito de sodio.

AT' = Absorbancia de la muestra tratada con hidrosulfito de sodio.

AS = Absorbancia del estándar sin hidrosulfito de sodio.

AS' = Absorbancia del estándar tratado con hidrosulfito de sodio.

CAPITULO V

RESULTADOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.1 Resultados a partir de datos experimentales.

5.1.1 Ensayo 1 (sin aditivos)

5.1.1.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexos N° 13 y N° 16).

TABLA N° 4: RESULTADOS DEL ANALISIS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO POR EL METODO DEL PESO SECO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	LnX
0	0,05	-3,00
24	0,20	-1,61
48	0,20	-1,61
72	0,35	-1,05
96	2,50	0,92
168	1,45	0,37
192	1,20	0,18
216	1,80	0,59

Donde:

X: gramos de biomasa por litro de jugo de cáscara de piña (g/L).

TABLA Nº 5: CALCULO DE GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA. ENSAYO1.

X_i	X_{max}	$X_p = X_{max} - X_i$	$\%X_p = (X_p/X_{max}).100$
0.05	2.50	2.45	98.00

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_{max} : Concentración máxima de biomasa (g/L).

X_p : Cantidad de biomasa generada (g/L).

$\%X_p$: Generación porcentual de biomasa (%).

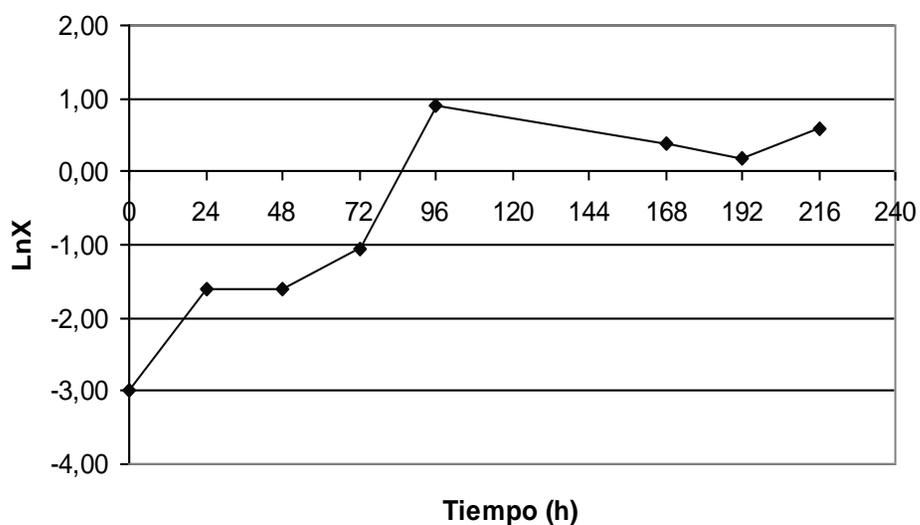


Figura Nº 10: Gráfica de LnX Vrs Tiempo. Ensayo 1.

La Figura N° 10 muestra la producción de biomasa a medida transcurre el tiempo a lo largo de la fermentación. En dicha gráfica se observa crecimiento de cero a 24 horas, sin embargo en el periodo de 24 a 48 horas se observa un pequeño periodo estacionario, lo cual puede ser el resultado de un reajuste metabólico de la levadura en respuesta a cambios en las condiciones del medio de producción (pH, concentración de sustrato, etc). La producción de biomasa va en aumento desde las 48 hasta las 96 horas del proceso fermentativo. A partir de las 96 horas se observa un decremento en la biomasa, después de las 192 horas se observa un crecimiento críptico o bien el crecimiento puede deberse a un ligero aumento en la concentración de sustrato debido a la liberación de monosacáridos almacenados en forma de celulosa (en el jugo de cáscara de piña). La mayor concentración de biomasa se observa a las 96 horas, dicha concentración representa un aumento porcentual en biomasa de un 98.00 por ciento.

Dado lo anterior, puede considerarse la fase de crecimiento como el periodo comprendido entre las cero y 96 horas del proceso, la fase de muerte se da entre las 96 y 192 horas. No se observa fase de latencia debido a que las levaduras se sometieron previamente a un periodo de adaptación en el medio de producción (preparación del inoculo). La fase estacionaria no se observa, probablemente se deba a que esta fase tuvo lugar entre las 96 y 168 horas de la fermentación, periodo durante el cual no hubo muestreo por ser días no laborales en el laboratorio de microbiología.

5.1.1.2 Rapidez específica de crecimiento (μ).

TABLA Nº 6: CÁLCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO.
ENSAYO 1.

Tiempo (h)	X_i	X_f	t_i	t_f	$\mu = d\ln X/dt$
0	-	0,05	-	0	0,0000
24	0,05	0,20	0	24	0,0578
48	0,20	0,20	24	48	0,0000
72	0,20	0,35	48	72	0,0233
96	0,35	2,50	72	96	0,0819
168	2,50	1,45	96	168	-0,0076
192	1,45	1,20	168	192	-0,0079
216	1,20	1,80	192	216	0,0169

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_f : Concentración final de biomasa (g/L).

t_i : Tiempo inicial en horas (h).

t_f : Tiempo final en horas (h).

μ : Rapidez específica de crecimiento (1/h).

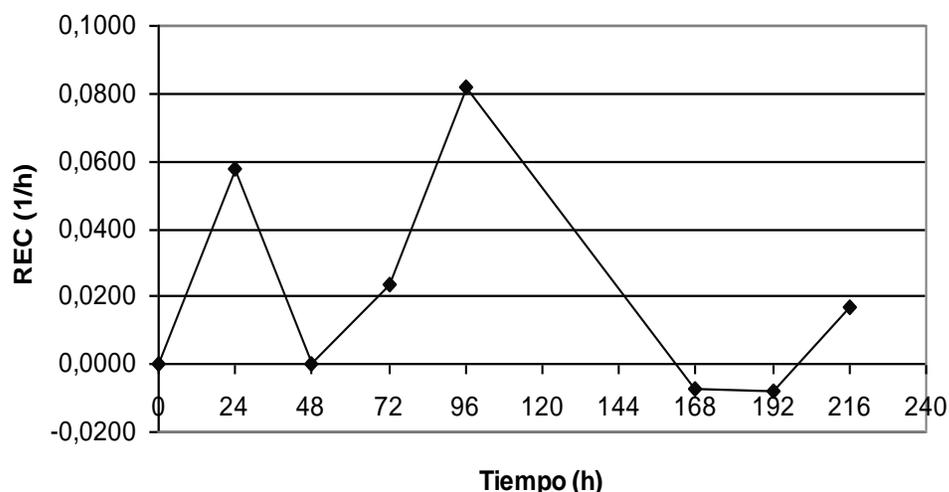


Figura Nº 11: Gráfica de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 1.

La Figura Nº 11 muestra la rapidez del aumento de la concentración celular en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. Sus valores representan la fracción de biomasa que se produce en un periodo dado respecto a la producción total en un punto específico a lo largo del proceso en la unidad de tiempo. En dicha gráfica observamos que la mayor tasa de producción por unidad de tiempo se da a las 96 horas del proceso, es decir, es en este punto donde hay una mayor tendencia al crecimiento, este punto corresponde al final de la fase de crecimiento. Se observa que REC aumenta en el periodo de cero a 24 horas y toma un valor de cero a las 48 horas, esto indica que la biomasa se ha mantenido constante en ese punto específico. De las 48 a 96 horas la REC va en aumento y a partir del periodo comprendido entre las 96 y 192 horas se observa un decremento en la REC, y aumenta nuevamente a las 216 horas.

Puede considerarse que la REC va en aumento en el periodo comprendido entre Cero y 96 horas, el cual corresponde a la fase de crecimiento y disminuye entre las 96 y 192 horas que corresponde a la fase de muerte. Los valores negativos de REC representan la disminución la biomasa en ese punto específico a lo largo del proceso.

5.1.1.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexos N° 17,18 Y 19).

TABLA N° 7: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE AZÚCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL – SULFÚRICO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	C. Sustrato en biorreactor (g/L)
0	0,3486
24	0,2653
48	0,2807
72	0,2591
96	0,2375
168	0,2036
192	0,2283
216	0,2314

TABLA Nº 8: CALCULO DEL CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO.
ENSAYO 1.

Si	Smin	Sc = Si - Smin	%Sc = (Sc/Si).100
0.3486	0.2036	0.1450	41.59

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Smin: Concentración mínima de sustrato observada (g/L).

Sc: Cantidad de sustrato consumido (g/L).

%Sc: Consumo porcentual de sustrato (%).

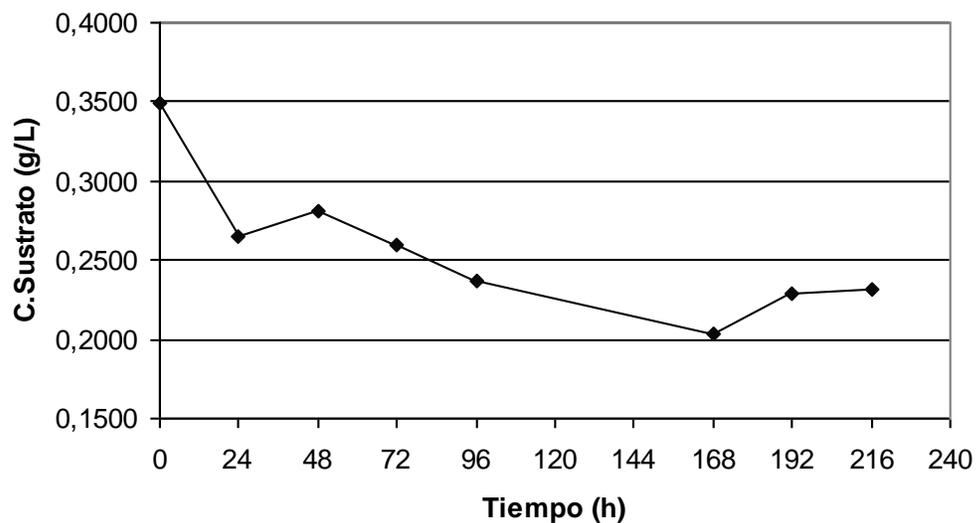


Figura Nº 12: Gráfica de concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Ensayo1.

La Figura Nº 12 describe el consumo de sustrato (azúcares totales) a lo largo del proceso fermentativo. En general se observa que la concentración de

azúcares presentes en el medio de producción va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, excepto en los periodos comprendidos entre las 24 y 48 horas, y entre las 168 y 216 horas, en dichos periodos se observa un aumento en la concentración de azúcares, este fenómeno puede deberse a la liberación de azúcares almacenados en el medio de producción en forma de celulosa u otros polisacáridos, que por la acción de enzimas extracelulares (invertasas, celulasas, amilasas, etc) son hidrolizados a unidades de glucosa.⁽⁸⁾ La concentración mínima de sustrato se observa a las 168 horas, dicha concentración representa un consumo del 41.59 por ciento del sustrato.

5.1.1.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

TABLA Nº 9: CALCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Si	Sf	ti	tf	QS =-ds/dt
0	-	0,3486	-	0	0,00E+00
24	0,3486	0,2653	0	24	3,47E-03
48	0,2653	0,2807	24	48	-6,42E-04
72	0,2807	0,2591	48	72	9,00E-04
96	0,2591	0,2375	72	96	9,00E-04
168	0,2375	0,2036	96	168	4,71E-04
192	0,2036	0,2283	168	192	-1,03E-03
216	0,2283	0,2314	192	216	-1,29E-04

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

QS: Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h).

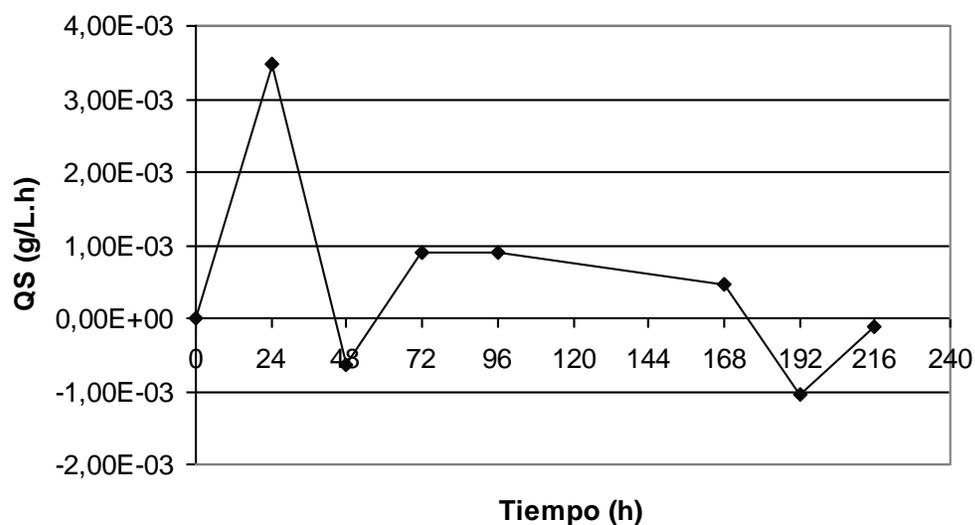


Figura N° 13: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.

La figura N° 13 describe los gramos de sustrato (azúcares totales) que se consumen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo a lo largo del proceso fermentativo. En dicha gráfica se observa que los azúcares se consumen con mayor velocidad al inicio de la fase de crecimiento (periodo de cero a 24 horas). QS toma un valor negativo a las 48 horas. A las 72 horas QS aumenta nuevamente, y se mantiene constante hasta las 96 horas del proceso,

lo cual indica que en estos puntos los azúcares se consumen en la misma proporción por unidad de tiempo. QS disminuye desde las 96 hasta las 168 horas, este periodo corresponde a la fase de muerte. Los valores negativos de QS indican que en esos puntos ha habido un aumento en la concentración de azúcares.

5.1.1.5 Rapidez específica de consumo de sustrato (qs).

TABLA N° 10: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	X	Si	Sf	ti	tf	-qs = -1/x.(ds/dt)
0	-	-	0,3486	-	0	0,00E+00
24	0,20	0,3486	0,2653	0	24	1,74E-02
48	0,20	0,2653	0,2807	24	48	-3,21E-03
72	0,35	0,2807	0,2591	48	72	2,57E-03
96	2,50	0,2591	0,2375	72	96	3,60E-04
168	1,45	0,2375	0,2036	96	168	3,25E-04
192	1,20	0,2036	0,2283	168	192	-8,58E-04
216	1,80	0,2283	0,2314	192	216	-7,18E-05

Donde:

X: Concentración de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

qs: Rapidez específica de consumo de sustrato (g/g.h).

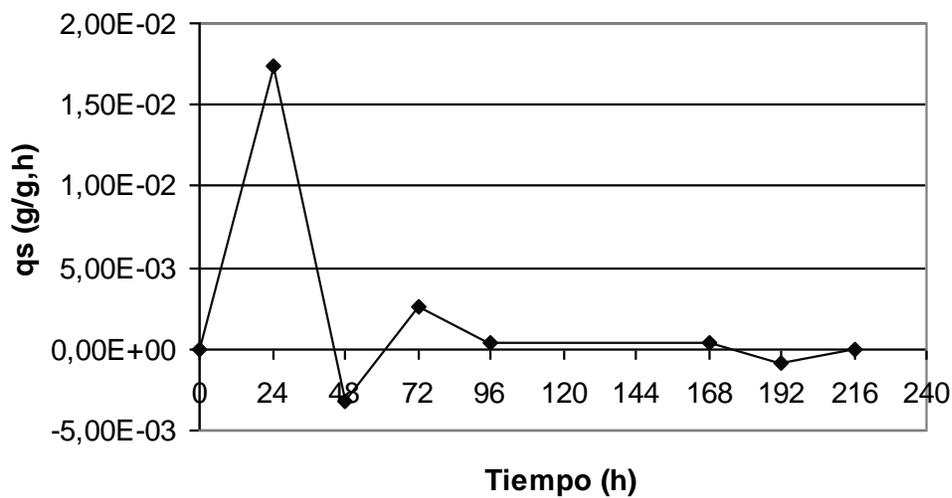


Figura N° 14: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.

La Figura N° 14 describe los gramos de sustrato (azúcares totales) que se consumen por cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de q_s se da a las 24 horas del proceso, lo cual corresponde al inicio de la fase de crecimiento. q_s toma un valor negativo a las 48 horas. A las 72 horas q_s aumenta nuevamente y disminuye a las 96 horas, disminuyendo levemente a las 168 horas. Los valores negativos de q_s indican que en esos puntos ha habido un aumento en la concentración de azúcares.

5.1.1.6. Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexo N° 22).

TABLA N° 11: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	C. Riboflavina (µg/ml)	C. Riboflavina (g/L)
0	1,87	0,00187
24	1,96	0,00196
48	1,77	0,00177
72	1,96	0,00196
96	1,77	0,00177
168	1,36	0,00136
192	1,41	0,00141
216	1,52	0,00152

TABLA N° 12: CALCULO DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA. ENSAYO 1.

Pi	Pmax	P = Pmax - Pi	%Pp = (P/Pmax).100
0.00187	0.00196	0.00009	4.46

Donde:

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pmax: Concentración máxima de riboflavina observada (g/L).

Pp: Cantidad de riboflavina Producida (g/L).

%Pp: Porcentaje de producción de riboflavina (g/L).

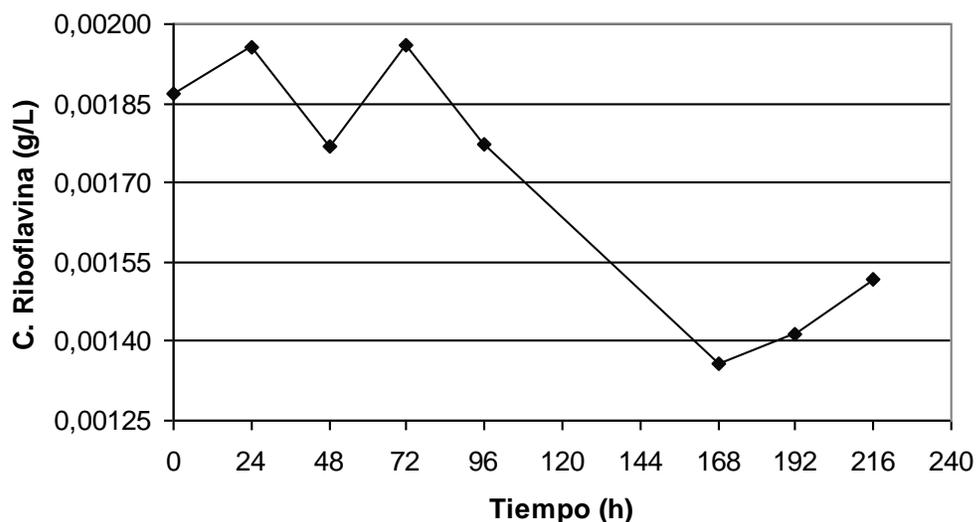


Figura N° 15: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 1.

La Figura N° 15 muestra la producción de Riboflavina a medida transcurre el tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa una producción por encima de la concentración inicial a las 24 horas, a las 48 horas la cantidad de riboflavina disminuye por debajo de los valores iniciales y vuelve a subir a las 72 horas del proceso presentando nuevamente un valor por encima de la concentración inicial. A partir de las 72 horas la concentración de riboflavina disminuye, y aumenta nuevamente a partir de las 168 horas, sin embargo la

producción observada entre las 168 y 216 horas no excede a la concentración inicial de vitamina (cero horas). Entonces tenemos que la máxima concentración de vitamina se da a las 24 y 72 horas del proceso de producción, estos puntos se encuentran dentro de la fase de crecimiento. Las concentraciones máximas observadas representan un aumento porcentual en riboflavina de un 4.46 por ciento. El decremento observado en la concentración de riboflavina puede deberse a que la levadura podría estar utilizando la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático.

5.1.1.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

TABLA Nº 13: CALCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO (QP). ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Pi	Pf (g/L)	ti	tf	QP = dp/dt
0	-	0,00187	-	0	0,00E+00
24	0,00187	0,00196	0	24	3,75E-06
48	0,00196	0,00177	24	48	-7,92E-06
72	0,00177	0,00196	48	72	7,92E-06
96	0,00196	0,00177	72	96	-7,92E-06
168	0,00177	0,00136	96	168	-5,69E-06
192	0,00136	0,00141	168	192	2,08E-06
216	0,00141	0,00152	192	216	4,58E-06

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

QP: Rapidez volumétrica de formación de producto (g/L.h).

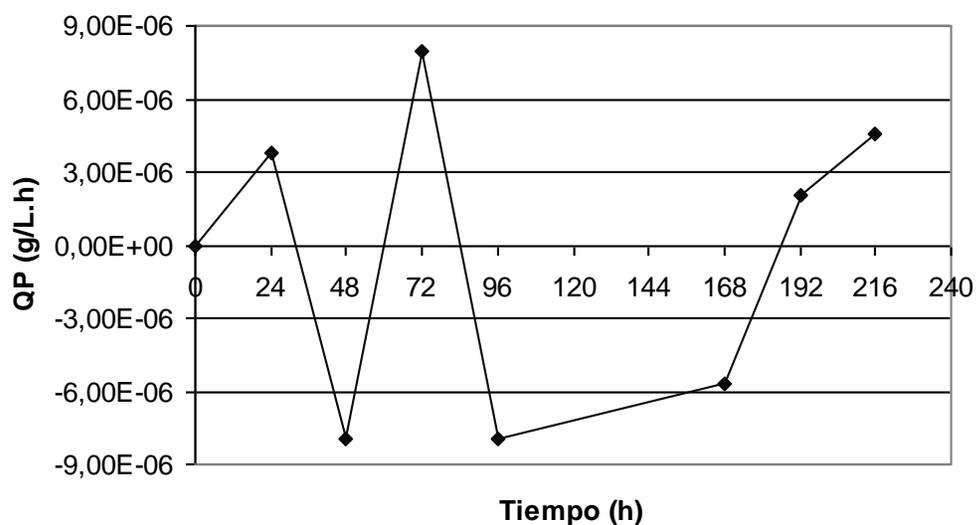


Figura N° 16: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 1.

La Figura N° 16 describe los gramos de Riboflavina que se producen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que la vitamina se produce con mayor velocidad a las 72 horas del proceso, este punto se encuentra dentro de la fase de crecimiento. QP disminuye en el periodo comprendido de las 24 a 48 horas. Los valores negativos de QP indican que la levadura ha utilizado la Flavina mononucleótido

(FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático. Se experimenta un aumento considerable en QP a partir de las 168 horas. La pendiente positiva con valores negativos de QP que se observa en el periodo de 96 a 168 horas, indica que la vitamina esta dejando de ser consumida para empezar de nuevo con la producción.

5.1.1.8 Rapidez especifica de formación de producto (qp).

TABLA Nº 14: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Xf	Pi	Pf	ti	tf	qp = 1/x.(dp/dt)
0	-	-	0,00187	-	0	0,00E+00
24	0,20	0,00187	0,00196	0	24	1,88E-05
48	0,20	0,00196	0,00177	24	48	-3,96E-05
72	0,35	0,00177	0,00196	48	72	2,26E-05
96	2,50	0,00196	0,00177	72	96	-3,17E-06
168	1,45	0,00177	0,00136	96	168	-3,93E-06
192	1,20	0,00136	0,00141	168	192	1,74E-06
216	1,80	0,00141	0,00152	192	216	2,55E-06

Donde:

X: Concentración de biomasa (g/L).

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de riboflavina (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

qp: Rapidez especifica de formación de producto (g/g.h).

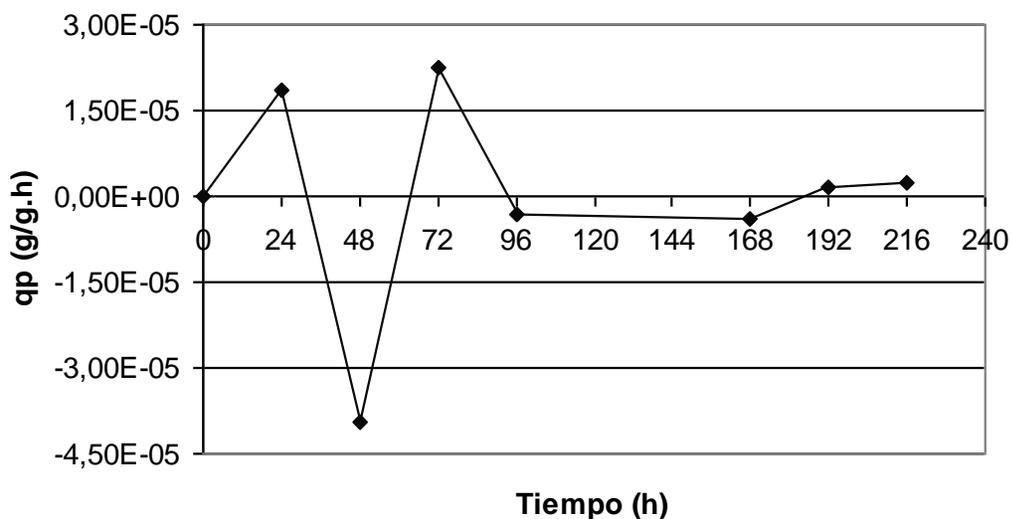


Figura N° 17: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 1.

La Figura N° 17 describe los gramos de riboflavina que se producen por cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de q_p se da a las 72 horas del proceso, lo cual corresponde a la fase de crecimiento. Los valores negativos de q_p indican que la levadura ha utilizado la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático. A partir de las 168 horas q_p va en aumento.

5.1.1.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

TABLA Nº 15: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	X_i	X_f	S_i	S_f	$Y_{x/s} = -dx/ds$
0	-	0,05	-	0,3486	0,0
24	0,05	0,20	0,3486	0,2653	1,8
48	0,20	0,20	0,2653	0,2807	0,0
72	0,20	0,35	0,2807	0,2591	6,9
96	0,35	2,50	0,2591	0,2375	99,5
168	2,50	1,45	0,2375	0,2036	-31,0
192	1,45	1,20	0,2036	0,2283	10,1
216	1,20	1,80	0,2283	0,2314	-193,5

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_f : Concentración final de biomasa (g/L).

S_i : Concentración inicial sustrato (g/L).

S_f : Concentración final de sustrato (g/L).

$Y_{x/s}$: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

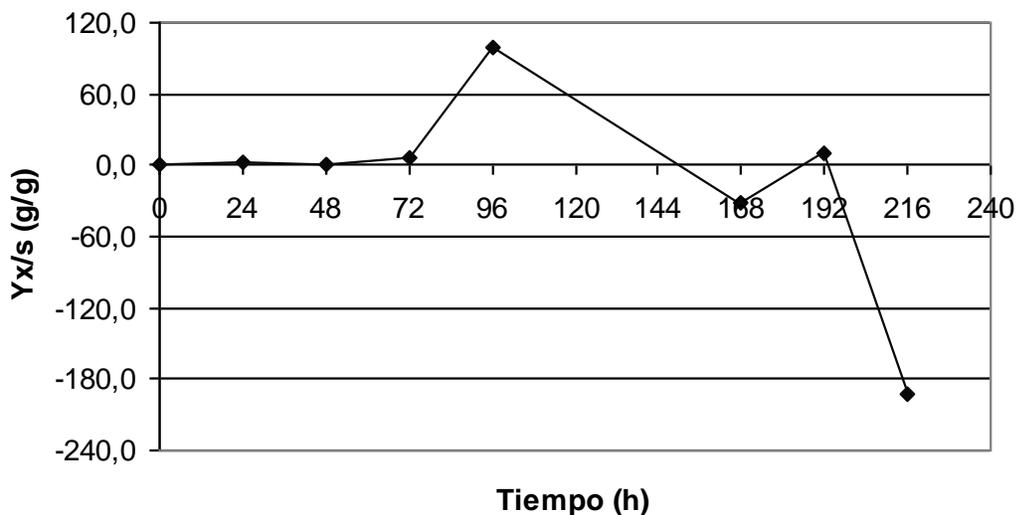


Figura N° 18: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.

La Figura N° 18 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de $Y_{x/s}$ se da a las 96 horas del proceso, esto indica que en este punto es en donde se da la mayor conversión de sustrato en biomasa. Cuando se observa un valor de $y_{x/s}$ igual a cero, esto indica que no ha habido conversión de sustrato en biomasa.

El Valor negativo que presenta $Y_{x/s}$ a las 168 horas, indica que se ha entrado en la fase de muerte y que la cantidad de sustrato consumido no genera la suficiente biomasa como para superar la tasa de mortandad celular. El Valor negativo que presenta $Y_{x/s}$ a las 216 horas, se debe a que ha habido un aumento en la concentración de sustrato en ese punto y que dicha concentración es suficiente para generar un aumento de biomasa, esto según lo

observado en la gráfica de biomasa, no es posible determinar el valor real de Y_x/s en dicho punto ya que a pesar de que es probable que la levadura esté consumiendo sustrato, no es posible cuantificar este consumo, ya que según lo observado, la velocidad de liberación de azúcares de la celulosa es mayor que la velocidad de consumo. A las 192 horas observamos un valor positivo de Y_x/s , este punto pertenece a la fase de muerte, y tiene un valor positivo debido a que a pesar de que en ese punto la concentración de sustrato aumenta, esto no es suficiente como para generar un aumento de biomasa, pero como vemos en la figura N° 11, si es suficiente para que la velocidad de generación de biomasa empiece a superar la velocidad de muerte y de esta forma generar un aumento de biomasa, lo que se observa a las 216 horas.

5.1.1.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (Y_p/s).

TABLA N° 16: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Pi	Pf	Si	Sf	$Y_p/s = -dp/ds$
0	-	0,00187	-	0,3486	0,00E+00
24	0,00187	0,00196	0,3486	0,2653	1,08E-03
48	0,00196	0,00177	0,2653	0,2807	1,23E-02
72	0,00177	0,00196	0,2807	0,2591	8,80E-03
96	0,00196	0,00177	0,2591	0,2375	-8,80E-03
168	0,00177	0,00136	0,2375	0,2036	-1,21E-02
192	0,00136	0,00141	0,2036	0,2283	-2,02E-03
216	0,00141	0,00152	0,2283	0,2314	-3,55E-02

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

YP/s: Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (g/g).

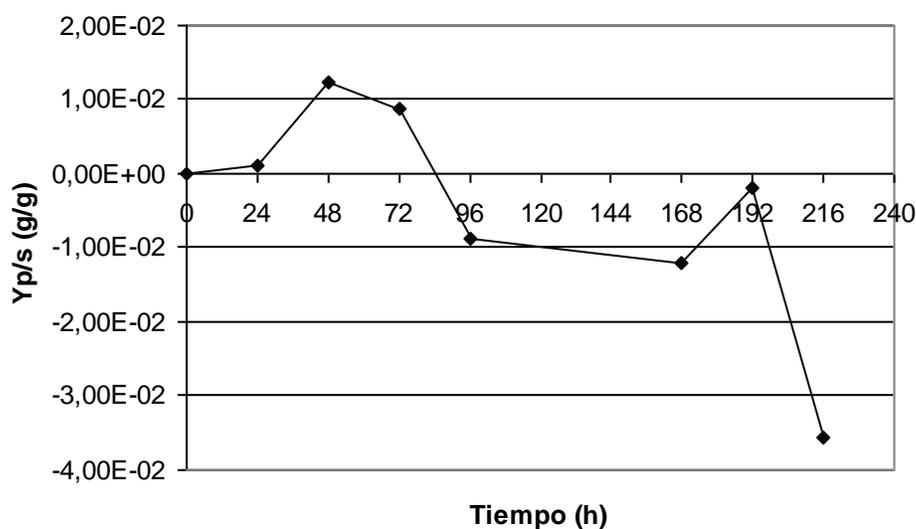


Figura Nº 19: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1.

La figura Nº 19 representa la eficacia de conversión del sustrato en producto.

Dicho de otra forma, representa la cantidad de riboflavina formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de Yp/s se da a las 72 horas del proceso, esto indica que en este punto es en donde se da la mayor conversión de sustrato vitamina. El valor alto de Yp/s observado a las 48 horas se debe a que en este punto se experimenta una

decaída en la concentración de vitamina y un aumento en la concentración de sustrato, de ahí que su signo sea positivo a pesar de que en este punto no se observa un aumento en la concentración de vitamina.

La pendiente negativa con valores negativos de Y_p/s observado entre las 96 y 168 horas indica que no ha habido conversión de sustrato en riboflavina en dichos puntos.

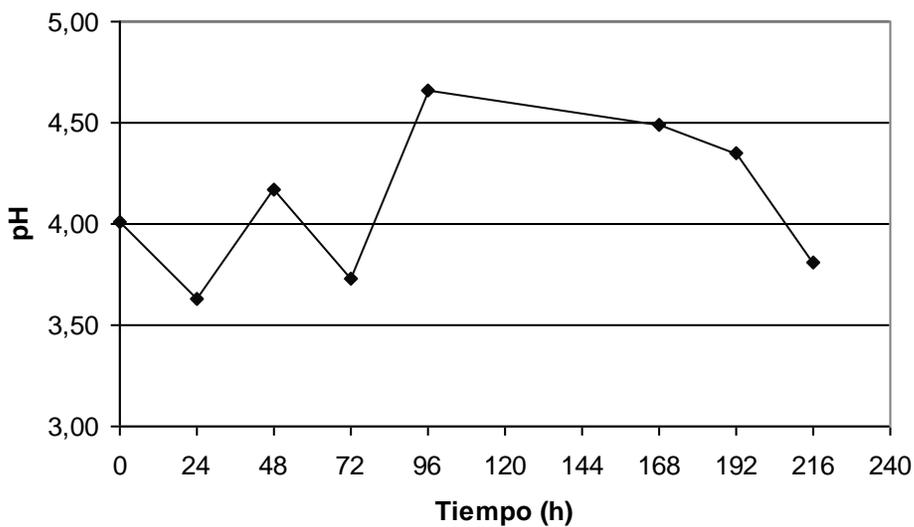
Los valores negativos observados a las 192 y 216 horas se deben a que en esos puntos se experimenta un aumento en la concentración de sustrato, lo cual es suficiente como para generar un aumento en la concentración de vitamina según lo observado en la figura 6, este fenómeno se ve reflejado en la figura 7 ya que a partir de las 168 horas se observa un aumento considerable en QP. No es posible determinar el valor real de Y_p/s en dichos puntos ya que a pesar de que es probable que la levadura esté consumiendo sustrato, no es posible cuantificar este consumo, ya que según lo observado, la velocidad de liberación de azúcares de la celulosa es mayor que la velocidad de consumo.

5.1.1.11 Determinación de pH.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al realizar mediciones de pH por triplicado a cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexo N° 25).

TABLA Nº 17: RESULTADOS DE LA MEDICION DEL PH. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	pH
0	4,01
24	3,63
48	4,17
72	3,73
96	4,66
168	4,49
192	4,35
216	3,81

**Figura Nº 20 : Gráfica de pH Vrs Tiempo. Ensayo 1.**

La figura Nº 20 muestra las variaciones de pH a lo largo del proceso fermentativo, dichas variaciones se deben a que la composición química del medio de cultivo se encuentra en constante cambio, consecuencia del consumo de sustrato y la generación de productos propios de los procesos fermentativos

(producción de etanol). En la gráfica podemos observar que el pH oscila entre 3.63 y 4.66, estos valores se encuentran dentro del intervalo óptimo requerido para el crecimiento de levaduras (3 – 6).

5.1.2 Ensayo 2 (Sacarosa como aditivo).

5.1.2.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso. (Anexos 14 y 16).

TABLA Nº 18: RESULTADOS DEL ANALISIS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO POR EL METODO DEL PESO SECO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	LnX
0	0,05	-3,00
24	0,35	-1,05
48	0,95	-0,05
72	0,80	-0,22
96	1,25	0,22
168	1,35	0,30
192	1,05	0,05
216	1,10	0,10

Donde:

X: gramos de biomasa por litro de jugo de cáscara de piña (g/L).

TABLA Nº 19: CALCULO DE GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA.
ENSAYO 2.

X_i	X_{max}	$X_p = X_{max} - X_i$	$\%X_p = (X_p/X_{max}) \cdot 100$
0,05	1,35	1,30	96,30

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_{max} : Concentración máxima de biomasa (g/L).

X_p : Cantidad de biomasa generada (g/L).

$\%X_p$: Generación porcentual de biomasa (%).

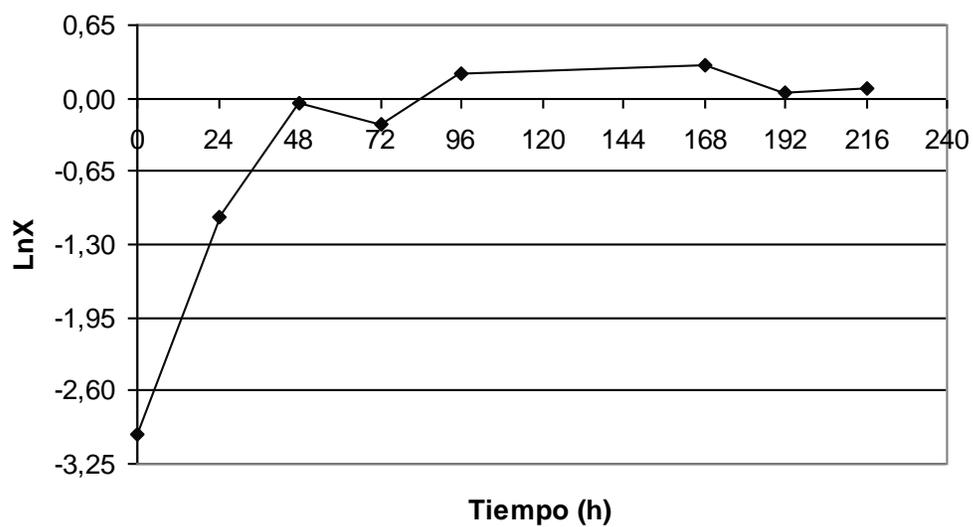


Figura Nº 21: Gráfica de LnX Vrs Tiempo. Ensayo 2.

La Figura N° 21 muestra la producción de biomasa a medida transcurre el tiempo a lo largo de la fermentación. En dicha gráfica se observa crecimiento de cero a 48 horas, sin embargo a las 72 horas se observa una leve decaída en la biomasa, lo cual puede ser el resultado de un reajuste metabólico de la levadura en respuesta a cambios en las condiciones del medio de producción (pH, concentración de sustrato, etc), La biomasa aumenta nuevamente a las 96 horas del proceso. Dado lo anterior, puede considerarse la fase de crecimiento como el periodo comprendido entre las cero y 96 horas del proceso.

En el periodo comprendido entre las 96 y las 168 horas se observa una leve pendiente positiva en la biomasa, este periodo puede considerarse como la fase estacionaria. Después de las 168 horas se observa una decaída en la biomasa, presentándose un leve crecimiento a las 216 horas del proceso.

La mayor concentración de biomasa se da a las 168 horas, que corresponde al final de la fase estacionaria, este fenómeno puede deberse a que durante el periodo de las fase estacionaria el catabolismo de la fuente de carbono y energía continua por algún tiempo después de que se agotan los nutrientes, dándose una acumulación de compuestos de reserva y aumento de la biomasa. El aumento porcentual en biomasa observado es de un 96.30 por ciento.

No se observa fase de latencia debido a que las levaduras se sometieron previamente a un periodo de adaptación en el medio de producción (preparación del inóculo).

5.1.2.2 Rapidez especifica de crecimiento (μ).

TABLA Nº 20: CÁLCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO.
ENSAYO 2.

Tiempo (h)	X_i	X_f	t_i	t_f	$\mu = d\ln X/dt$
0	-	0,05	-	0	0,0000
24	0,05	0,35	0	24	0,0811
48	0,35	0,95	24	48	0,0416
72	0,95	0,80	48	72	-0,0072
96	0,80	1,25	72	96	0,0186
168	1,25	1,35	96	168	0,0011
192	1,35	1,05	168	192	-0,0105
216	1,05	1,10	192	216	0,0019

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_f : Concentración final de biomasa (g/L).

t_i : Tiempo inicial en horas (h).

t_f : Tiempo final en horas (h).

μ : Rapidez especifica de crecimiento (1/h).

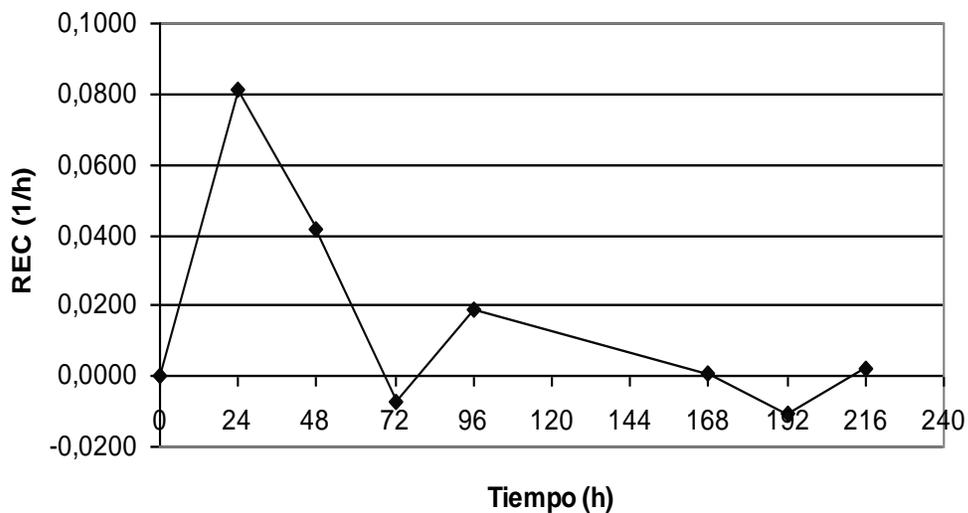


Figura Nº 22: Gráfica de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura Nº 22 muestra la rapidez del aumento de la concentración celular en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. Sus valores representan la fracción de biomasa que se produce en un periodo dado respecto a la producción total en un punto específico a lo largo del proceso en la unidad de tiempo. En dicha gráfica se observa que la REC va en aumento en el periodo de cero a 24 horas, y disminuye a las 48 horas, la REC toma valores negativos a las 72 y 192 horas del proceso, estos valores indican que ha habido una disminución de la biomasa en esos puntos. A partir de las 96 horas se observa un decremento en la REC, y aumenta nuevamente a las 216 horas del proceso. La mayor tasa de producción por unidad de tiempo se da a las 24 horas del proceso, es decir, es en este punto donde hay una mayor tendencia al crecimiento, este punto corresponde al inicio de la fase de crecimiento.

5.1.2.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexos N° 17, 18 y 20).

TABLA N° 21: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE AZÚCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL – SULFÚRICO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	C. Sustrato (g/L)
0	0,3547
24	0,2036
48	0,3270
72	0,2745
96	0,2653
168	0,2190
192	0,2499
216	0,2221

TABLA N° 22: CALCULO DEL CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO. ENSAYO 2.

Si	Smin	Sc = Si - Smin	%Sc = (Sc/Si).100
0,3547	0,2036	0,1512	42,61

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Smin: Concentración mínima de sustrato observada (g/L).

Sc: Cantidad de sustrato consumido (g/L).

%Sc: Consumo porcentual de sustrato (%).

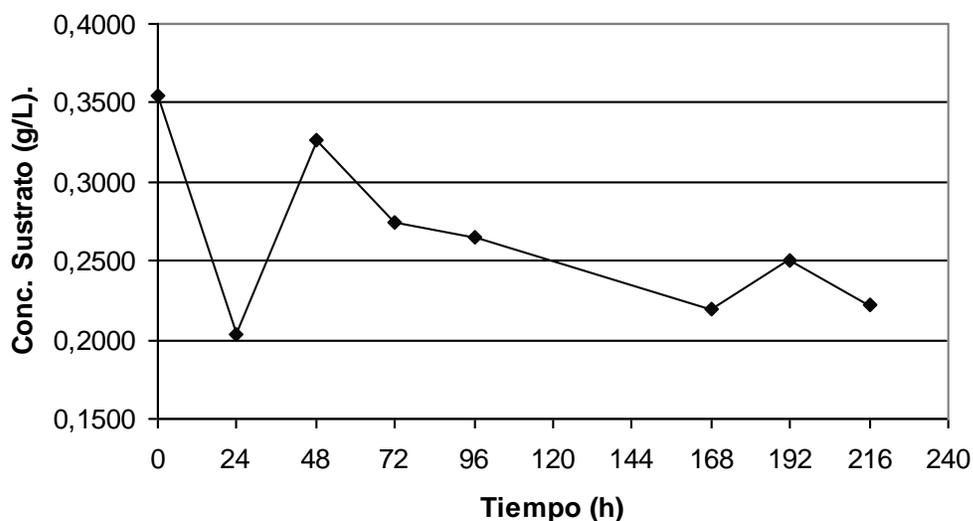


Figura N° 23: Gráfica de concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura N° 23 describe el consumo de sustrato (azúcares totales) a lo largo del proceso fermentativo. En general se observa que la concentración de azúcares presentes en el medio de producción va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, excepto en los periodos comprendidos entre las 24 y 48 horas, y entre las 168 y 192 horas, en dichos periodos se observa un aumento en la concentración de azúcares, este fenómeno puede deberse a la liberación de azúcares almacenados en el medio de producción en forma de celulosa u otros polisacáridos, que por la acción de enzimas extracelulares (invertasas, celulasas, amilasas, etc) son hidrolizados a unidades de glucosa.⁽⁸⁾ La concentración mínima de sustrato se observa a las 24 horas, dicha concentración representa un consumo del 42.61 por ciento del sustrato.

5.1.2.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

TABLA Nº 23: CALCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Si	Sf	ti	tf	QS =-ds/dt
0	-	0,3547	-	0	0,00E+00
24	0,3547	0,2036	0	24	6,30E-03
48	0,2036	0,3270	24	48	-5,14E-03
72	0,3270	0,2745	48	72	2,19E-03
96	0,2745	0,2653	72	96	3,83E-04
168	0,2653	0,2190	96	168	6,43E-04
192	0,2190	0,2499	168	192	-1,29E-03
216	0,2499	0,2221	192	216	1,16E-03

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

QS: Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h)

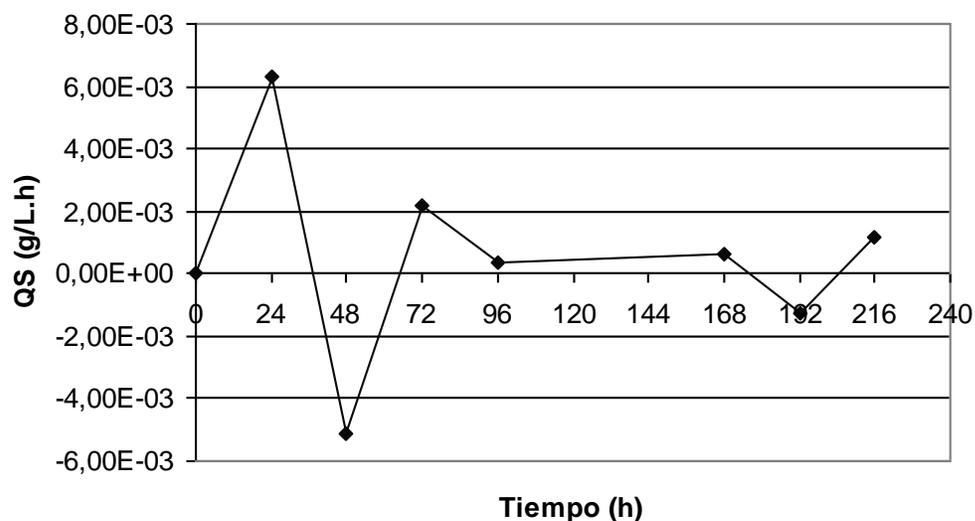


Figura N° 24: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura N° 24 describe los gramos de sustrato (azúcares totales) que se consumen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que los azúcares se consumen con mayor velocidad al inicio de la fase de crecimiento (periodo de cero a 24 horas), los valores negativos de QS indican que en esos puntos se experimenta un aumento en la concentración de azúcares. A las 72 horas QS aumenta nuevamente y disminuye a las 96 horas, QS aumenta levemente en el periodo de las 96 a las 168 horas, periodo que corresponde con la leve pendiente positiva observada en la fase estacionaria. El aumento de QS a las 216 horas, corresponde con la etapa de crecimiento observado después de un breve periodo de muerte.

5.1.2.5 Rapidez especifica de consumo de sustrato (qs).

TABLA Nº 24: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Xf	Si	Sf	ti	tf	qs =-1/x.(ds/dt)
0	-	-	0,3547	-	0	0,00E+00
24	0,35	0,3547	0,2036	0	24	1,80E-02
48	0,95	0,2036	0,3270	24	48	-5,41E-03
72	0,80	0,3270	0,2745	48	72	2,73E-03
96	1,25	0,2745	0,2653	72	96	3,07E-04
168	1,35	0,2653	0,2190	96	168	4,76E-04
192	1,05	0,2190	0,2499	168	192	-1,23E-03
216	1,10	0,2499	0,2221	192	216	1,05E-03

Donde:

X: Concentración de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

qs: Rapidez especifica de consumo de sustrato (g/g.h).

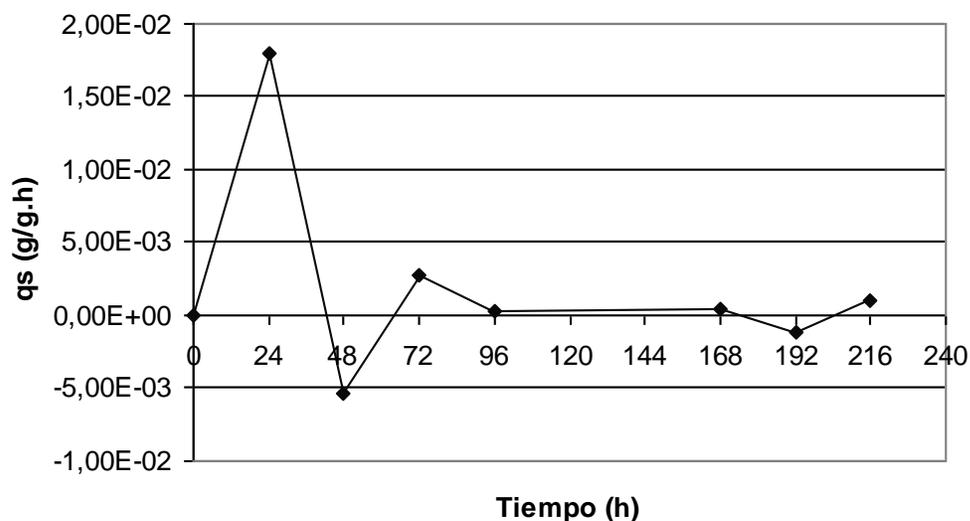


Figura N° 25: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura N° 25 describe los gramos de sustrato (azúcares totales) que se consumen por cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de q_s se da a las 24 horas del proceso, lo cual corresponde al inicio de la fase de crecimiento.

A las 72 horas el valor de q_s aumenta nuevamente a pesar de que en este punto se experimenta una leve decaída en la biomasa, esto indica que el sustrato consumido en este punto se utiliza como fuente de energía para el mantenimiento de las funciones celulares y no para la generación de material celular, lo cual es evidente en la figura 20. q_s disminuye a las 96 horas, sin embargo los azúcares consumidos en este punto si son destinados a la generación de biomasa según lo observado en la figura 12. q_s aumenta levemente en el período de las 96 a las 168 horas, periodo que corresponde a

la fase estacionaria. El aumento de q_s a las 216 horas, corresponde con la etapa de crecimiento observado después de un breve periodo de muerte. El menor valor de q_s se da a las 96 horas, lo cual corresponde al final de la fase de crecimiento. Los valores negativos de q_s indican que en esos puntos ha habido un aumento en la concentración de azúcares.

5.1.2.6. Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexo N° 23).

TABLA N° 25: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	C Vit. B2 ($\mu\text{g/ml}$)	C Vit. B2 (g/L)
0	1,92	0,00192
24	2,12	0,00212
48	1,63	0,00163
72	1,23	0,00123
96	1,40	0,00140
168	1,65	0,00165
192	1,28	0,00128
216	1,60	0,00160

TABLA N° 26: CALCULO DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA. ENSAYO 2.

Pi	Pmax	Pp = Pmax - Pi	%Pp = (Pp/Pmax).100
0,00192	0,00212	0,00019	9,12

Donde:

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pmax: Concentración máxima de riboflavina observada (g/L).

Pp: Cantidad de riboflavina Producida (g/L).

%Pp: Porcentaje de producción de riboflavina (g/L).

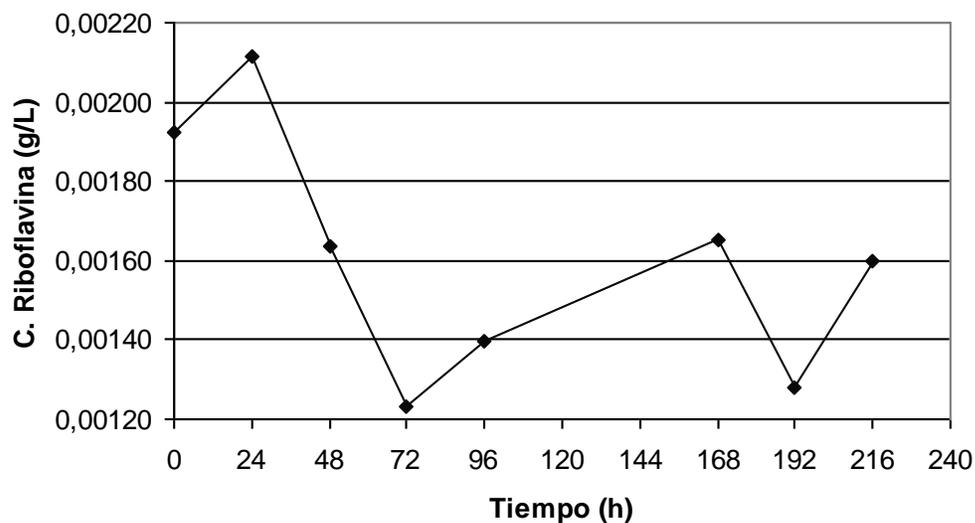


Figura N° 26: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura N° 26 muestra la producción de Riboflavina a medida transcurre el tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa una producción por encima de la concentración inicial a las 24 horas. A partir de las 24 horas la

concentración de riboflavina disminuye, y aumenta nuevamente después de las 72 horas, La concentración de vitamina disminuye nuevamente a las 192 horas y aumenta a las 216 horas del proceso. La producción observada a las 168 y 216 horas no excede a la concentración inicial de vitamina (cero horas).

Entonces tenemos que la máxima concentración de vitamina se da a las 24 horas del proceso de producción, este punto corresponde al inicio de la fase de crecimiento y dicha concentración representa un aumento porcentual en riboflavina de un 9.12 por ciento. El decremento observado en la concentración de riboflavina puede deberse a que la levadura podría estar utilizando la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático.

5.1.2.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

TABLA N° 27: CALCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO (QP). ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Pi	Pf	ti	tf	QP = dp/dt
0	-	0,00192	-	0	0,00E+00
24	0,00192	0,00212	0	24	8,33E-06
48	0,00212	0,00163	24	48	-2,04E-05
72	0,00163	0,00123	48	72	-1,67E-05
96	0,00123	0,00140	72	96	7,08E-06
168	0,00140	0,00165	96	168	3,47E-06
192	0,00165	0,00128	168	192	-1,54E-05
216	0,00128	0,00160	192	216	1,33E-05

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

QP: Rapidez volumétrica de formación de producto (g/L.h).

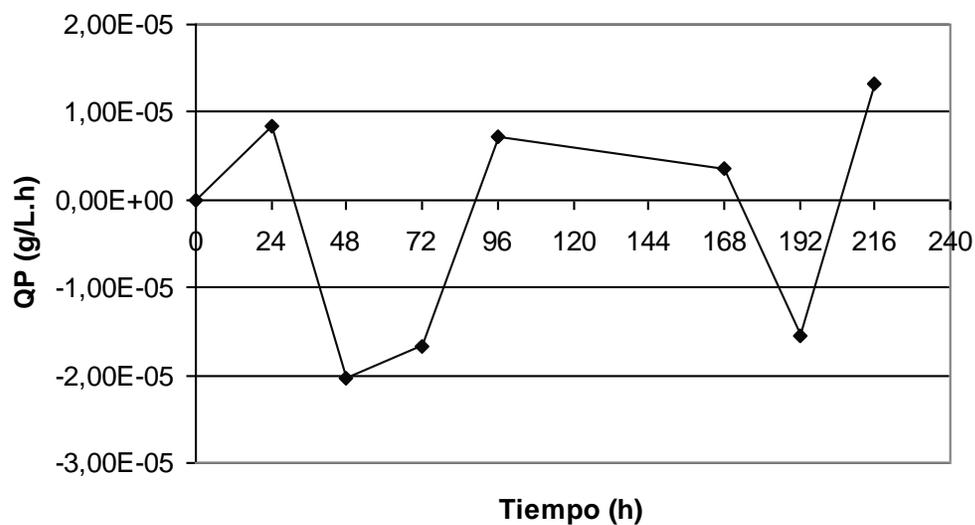


Figura Nº 27: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura Nº 27 describe los gramos de Riboflavina que se producen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que la vitamina se produce con mayor velocidad a las 216 horas del proceso. Los valores negativos de QP indican que la levadura ha utilizado la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor

enzimático. La pendiente positiva con valores negativos de QP que se observa en el periodo de 48 a 72 horas, indica que la vitamina esta dejando de ser consumida para empezar de nuevo con la producción.

5.1.2.8 Rapidez especifica de formación de producto (qp).

TABLA Nº 28: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Xf	Pi	Pf	ti	tf	qp = 1/x.(dp/dt)
0	-	-	0,00192	-	0	0,00E+00
24	0,35	0,00192	0,00212	0	24	2,38E-05
48	0,95	0,00212	0,00163	24	48	-2,15E-05
72	0,80	0,00163	0,00123	48	72	-2,08E-05
96	1,25	0,00123	0,00140	72	96	5,67E-06
168	1,35	0,00140	0,00165	96	168	2,57E-06
192	1,05	0,00165	0,00128	168	192	-1,47E-05
216	1,10	0,00128	0,00160	192	216	1,21E-05

Donde:

X: Concentración de biomasa (g/L).

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de riboflavina (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

qp: Rapidez especifica de formación de producto (g/g.h).

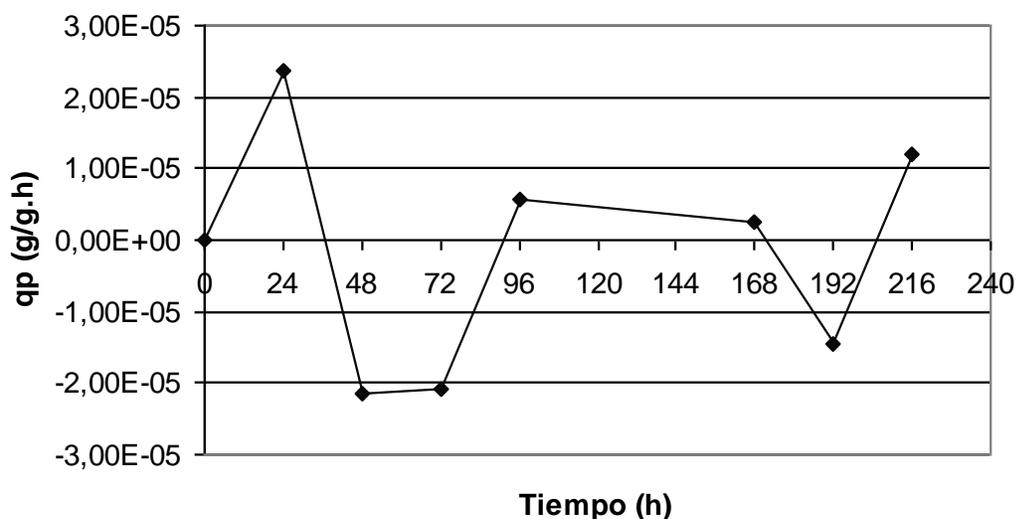


Figura N° 28: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura N° 28 describe los gramos de riboflavina que se producen por cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de q_p se da a las 24 horas del proceso, lo cual corresponde al inicio de la fase de crecimiento. Los valores negativos de q_p indican que la levadura ha utilizado la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático. La pendiente positiva con valores negativos de Q_P que se observa en el periodo de 48 a 72 horas, indica que la vitamina está dejando de ser consumida para empezar de nuevo con la producción.

5.1.2.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

TABLA Nº 29: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	X_i	X_f	S_i	S_f	$Y_{x/s} = -dx/ds$
0	-	0,05	-	0,3547	0,0
24	0,05	0,35	0,3547	0,2036	2,0
48	0,35	0,95	0,2036	0,3270	-4,9
72	0,95	0,80	0,3270	0,2745	-2,9
96	0,80	1,25	0,2745	0,2653	48,9
168	1,25	1,35	0,2653	0,2190	2,2
192	1,35	1,05	0,2190	0,2499	9,7
216	1,05	1,10	0,2499	0,2221	1,8

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_f : Concentración final de biomasa (g/L).

S_i : Concentración inicial sustrato (g/L).

S_f : Concentración final de sustrato (g/L).

$Y_{x/s}$: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

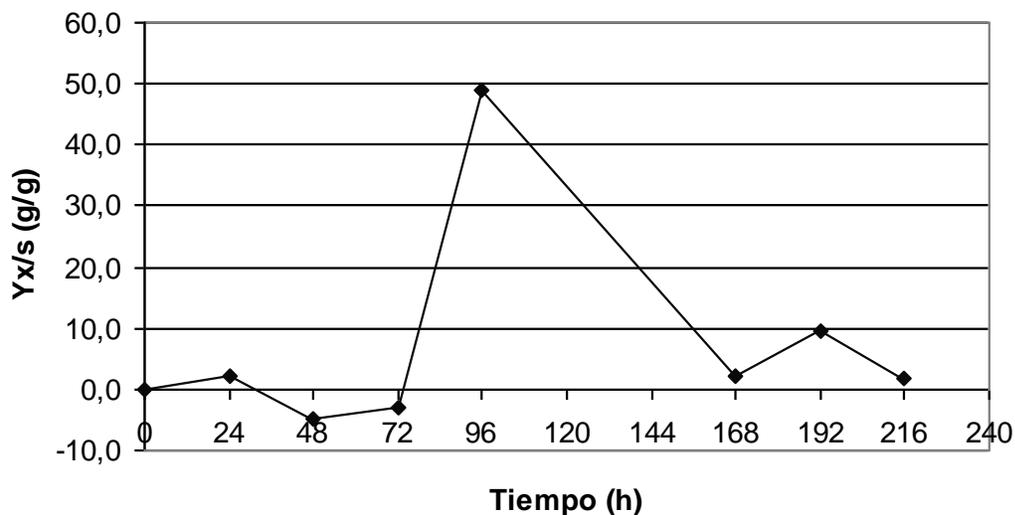


Figura Nº 29: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura Nº 29 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de $Y_{x/s}$ se da a las 96 horas del proceso, esto indica que en este punto es donde se da la mayor conversión de sustrato en biomasa. El Valor negativo que presenta $Y_{x/s}$ a las 48 horas, se debe a que ha habido un aumento en la concentración de sustrato en ese punto, mientras que el Valor negativo que presenta $Y_{x/s}$ a las 72 horas, se debe a que se ha entrado en un periodo de muerte, lo que indica que el sustrato consumido no es utilizado para general material celular, si no que probablemente sea utilizado como fuente de energía para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula. A las 192 horas observamos un valor positivo de $Y_{x/s}$, este punto pertenece a la fase de muerte,

y tiene un valor positivo debido a que en ese punto la concentración de sustrato aumenta y la biomasa disminuye.

5.1.2.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$).

TABLA Nº 30: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Pi	Pf	Si	Sf	$Y_{p/s} = -dp/ds$
0	-	0,00192	-	0,3547	0,00E+00
24	0,00192	0,00212	0,3547	0,2036	1,32E-03
48	0,00212	0,00163	0,2036	0,3270	3,97E-03
72	0,00163	0,00123	0,3270	0,2745	-7,62E-03
96	0,00123	0,00140	0,2745	0,2653	1,85E-02
168	0,00140	0,00165	0,2653	0,2190	5,40E-03
192	0,00165	0,00128	0,2190	0,2499	1,20E-02
216	0,00128	0,00160	0,2499	0,2221	1,15E-02

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

$Y_{p/s}$: Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (g/g).

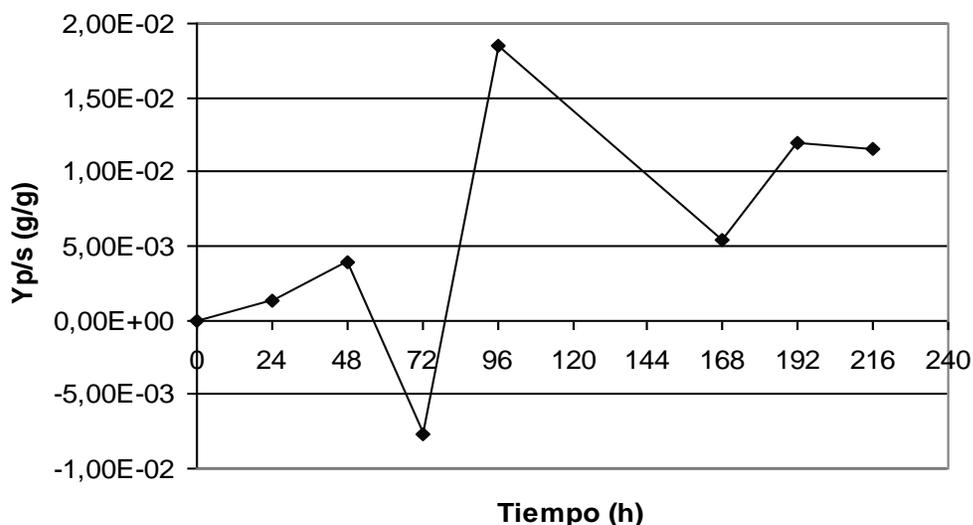


Figura Nº 30: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.

La Figura Nº 30 representa la eficacia de conversión del sustrato en producto. Dicho de otra forma, representa la cantidad de riboflavina formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de $Y_{p/s}$ se da a las 96 horas del proceso, esto indica que en este punto es en donde se da la mayor conversión de sustrato en vitamina. Los valores positivos de $Y_{p/s}$ observados a las 48 y 192 horas se deben a que en estos puntos se experimenta una decaída en la concentración de vitamina y un aumento en la concentración de sustrato, de ahí que su signo sea positivo, a pesar de que en este punto no se observa un aumento en la concentración de vitamina. El valor negativo observado a las 72 horas se debe a que en ese punto se experimenta una disminución en la concentración de vitamina, lo cual indica que el sustrato consumido en este punto no es utilizado para la producción de vitamina.

5.1.2.11 Determinación de pH.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al realizar mediciones de pH por triplicado a cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexo N° 26).

TABLA N° 31: RESULTADOS DE LA MEDICION DEL PH. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	pH
0	3,93
24	4,12
48	3,38
72	3,27
96	3,48
168	3,37
192	3,61
216	3,57

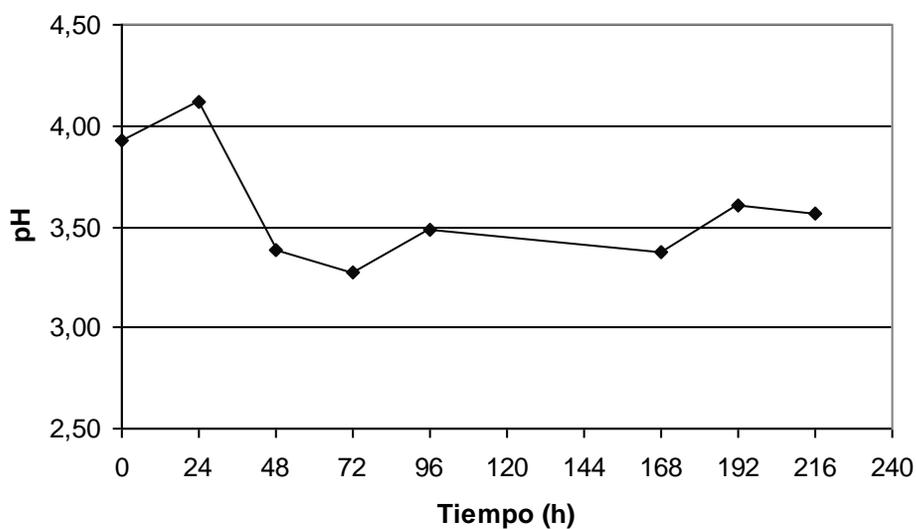


Figura N° 31: Gráfica de pH Vrs Tiempo. Ensayo 2.

La figura N° 31 muestra las variaciones de pH a lo largo del proceso fermentativo, dichas variaciones se deben a que la composición química del medio de cultivo se encuentra en constante cambio, consecuencia del consumo de sustrato y la generación de productos propios de los procesos fermentativos (producción de etanol). En la gráfica podemos observar que el pH oscila entre 3.27 y 4.12, estos valores se encuentran dentro del intervalo óptimo requerido para el crecimiento de levaduras (3 – 6).

5.1.3 Ensayo 3 (Sacarosa y sales inorgánicas como aditivos).

5.1.3.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexos N° 15 y 16).

TABLA N° 32: RESULTADOS DEL ANALISIS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO POR EL METODO DEL PESO SECO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	LnX
0	0,05	-3,00
24	0,10	-2,30
48	0,65	-0,43
72	0,50	-0,69
96	0,35	-1,05
168	1,50	0,41
192	1,45	0,37
216	2,30	0,83

Donde:

X: gramos de biomasa por litro de jugo de cáscara de piña (g/L).

TABLA Nº 33: CALCULO DE GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA.
ENSAYO 3.

X_i	X_{max}	$X_p = X_{max} - X_i$	$\%X_p = (X_p/X_{max}).100$
0,05	2,30	2,25	97,83

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_{max} : Concentración máxima de biomasa (g/L).

X_p : Cantidad de biomasa generada (g/L).

$\%X_p$: Generación porcentual de biomasa (%).

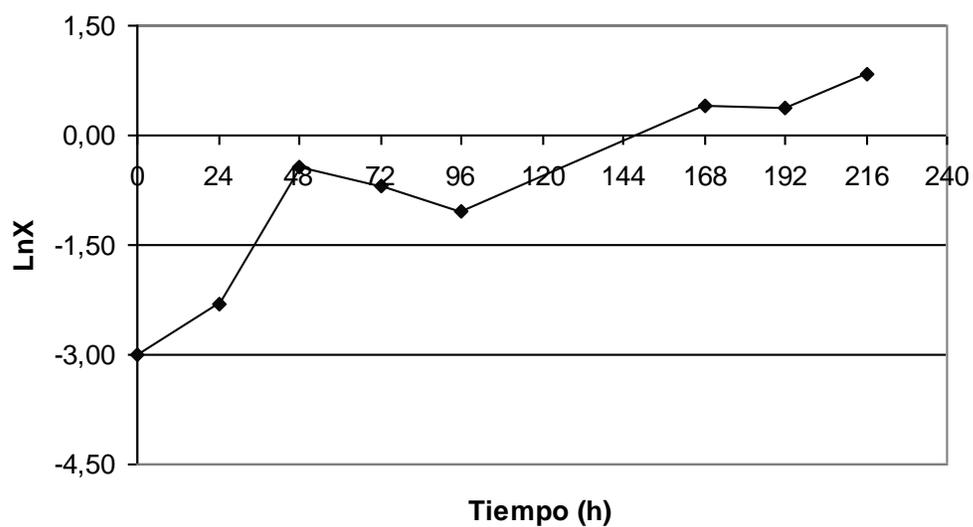


Figura Nº 32: Gráfica de LnX Vrs Tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 32 muestra la producción de biomasa a medida transcurre el tiempo a lo largo de la fermentación. En dicha gráfica se observa crecimiento de cero a 48 horas, después de las 48 horas se observa una decaída en la biomasa, lo cual puede ser el resultado de un reajuste metabólico de la levadura en respuesta a cambios en las condiciones del medio de producción (pH, concentración de sustrato, etc), la biomasa aumenta nuevamente a partir de las 96 horas, y experimenta una leve decaída en el periodo comprendido entre las 168 y 192 horas, después del cual sigue en aumento. Dado lo anterior, puede considerarse que la fase de crecimiento se mantiene a lo largo de todo el proceso. La mayor producción de biomasa se da a las 216 horas, que corresponde al final del proceso de producción, dicha concentración representa un aumento porcentual en biomasa de un 97.83 por ciento.

No se observa fase de latencia debido a que las levaduras se sometieron previamente a un periodo de adaptación en el medio de producción (preparación del inóculo). No se observa fase estacionaria ni de muerte, probablemente esto se deba a que en estas condiciones (composición del medio de producción) se necesita más tiempo para que dichas fases puedan observarse.

5.1.3.2 Rapidez especifica de crecimiento (μ).

TABLA Nº 34: CÁLCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO.
ENSAYO 3.

Tiempo (h)	X_i	X_f	t_i	t_f	$\mu = d\ln X/dt$
0	0,05	0,05	0	0	0,0000
24	0,05	0,10	0	24	0,0289
48	0,10	0,65	24	48	0,0780
72	0,65	0,50	48	72	-0,0109
96	0,50	0,35	72	96	-0,0149
168	0,35	1,50	96	168	0,0202
192	1,50	1,45	168	192	-0,0014
216	1,45	2,30	192	216	0,0192

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_f : Concentración final de biomasa (g/L).

t_i : Tiempo inicial en horas (h).

t_f : Tiempo final en horas (h).

μ : Rapidez especifica de crecimiento (1/h).

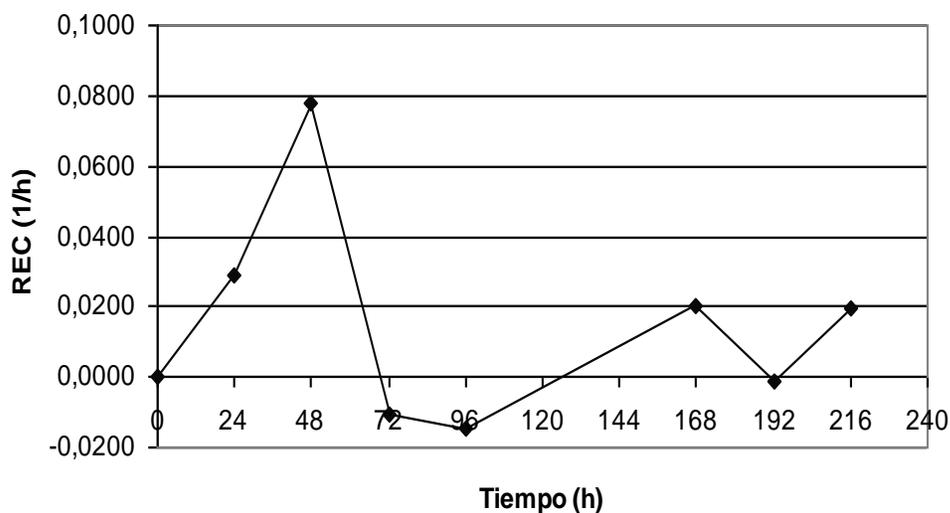


Figura Nº 33: Gráfica de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo.

La Figura Nº 33 muestra la rapidez del aumento de la concentración celular en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. Sus valores representan la fracción de biomasa que se produce en un periodo dado respecto a la producción total en un punto específico a lo largo del proceso en la unidad de tiempo. En dicha gráfica se observa que la REC va en aumento en el periodo de cero a 48 horas. REC toma valores negativos a las 72 y 96 horas, estos valores negativos representan la fracción de biomasa que disminuye por unidad de tiempo en dichos puntos. A partir de las 96 horas la REC va en aumento, y disminuye nuevamente a las 192 horas tomando un valor negativo debido a una leve disminución en la biomasa en este punto. La REC aumenta a las 216 horas. La mayor tasa de producción por unidad de tiempo se da a las 48 horas del proceso, es decir, es en este punto donde hay una mayor tendencia al crecimiento.

5.1.3.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexos 17, 18 y 21).

TABLA Nº 35: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE AZÚCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL – SULFÚRICO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	C. Sustrato (g/L)
0	0,3609
24	0,3332
48	0,3270
72	0,3208
96	0,3146
168	0,3208
192	0,3208
216	0,3270

TABLA Nº 36: CALCULO DEL CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO. ENSAYO 3.

Si	Smin	Sc = Si - Smin	%Sc = (Sc/Si).100
0,3609	0,3146	0,0463	12,82

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Smin: Concentración mínima de sustrato observada (g/L).

Sc: Cantidad de sustrato consumido (g/L).

%Sc: Consumo porcentual de sustrato (%).

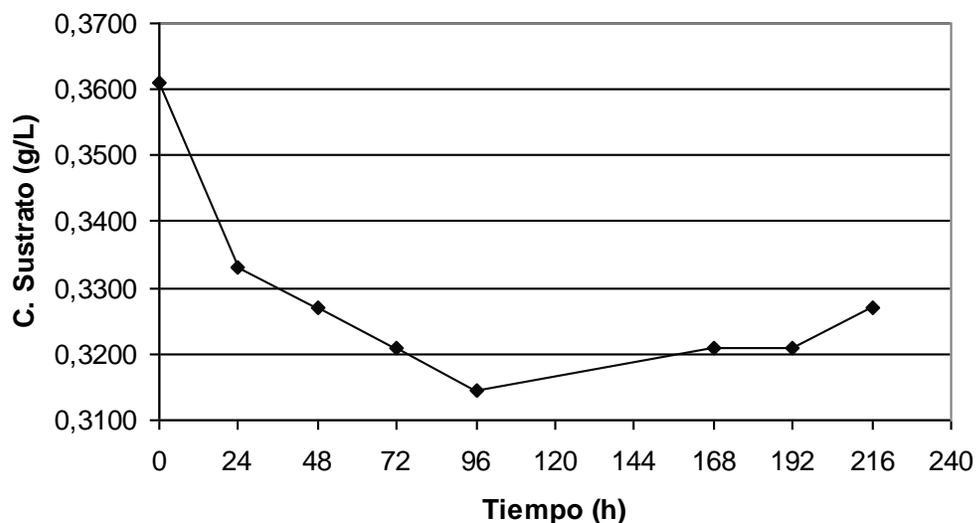


Figura N° 34: Gráfica de concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Ensayo 3.

La figura N° 34 describe el consumo de sustrato (azúcares totales) a lo largo del proceso fermentativo, en dicha gráfica se observa una disminución en la concentración de azúcares, lo cual se da dentro del periodo comprendido entre las cero y 96 horas, a partir de las 96 se observa un aumento en la concentración de azúcares, manteniendo un valor constante entre las 168 y 192 horas, después de este periodo la concentración de azúcares aumenta nuevamente. El aumento en las concentraciones de azúcares puede deberse a la liberación de azúcares almacenados en el medio de producción en forma de celulosa u otros polisacáridos, que por la acción de enzimas extracelulares (invertasas, celulasas, amilasas, etc) son hidrolizados a unidades de glucosa. (7)

La concentración mínima de sustrato se observa a las 96 horas, dicha concentración representa un consumo del 12.82 por ciento del sustrato.

5.1.3.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

TABLA Nº 37: CALCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Si	Sf	ti	tf	-QS =-ds/dt
0	-	0,3609	-	0	0,00E+00
24	0,3609	0,3332	0	24	1,15E-03
48	0,3332	0,3270	24	48	2,58E-04
72	0,3270	0,3208	48	72	2,58E-04
96	0,3208	0,3146	72	96	2,58E-04
168	0,3146	0,3208	96	168	-8,61E-05
192	0,3208	0,3208	168	192	0,00E+00
216	0,3208	0,3270	192	216	-2,58E-04

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

QS: Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h).

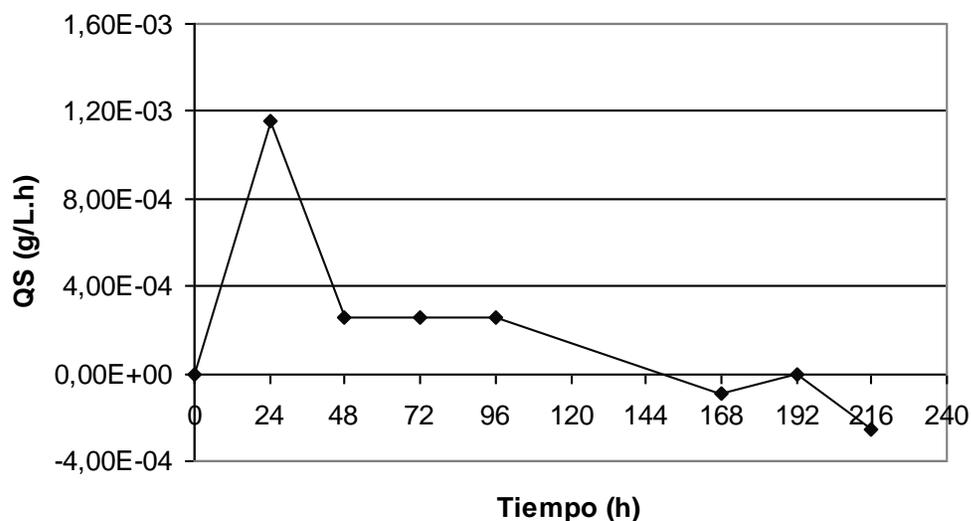


Figura N° 35: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 35 describe los gramos de sustrato (azúcares totales) que se consumen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que los azúcares se consumen con mayor velocidad a las 24 horas del proceso. QS decae a las 48 horas y mantiene un valor constante hasta las 96 horas, lo cual indica que en esos puntos los azúcares se consumen en la misma proporción. Los valores negativos de QS a las 168 y 216 horas se deben a que en esos puntos se experimenta un aumento en la concentración de azúcares. A las 192 horas QS es igual a cero, esto indica que en ese punto la concentración de azúcares se mantiene constante.

5.1.3.5 Rapidez especifica de consumo de sustrato (qs).

TABLA Nº 38: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Xf	Si	Sf	ti	tf	qs =-1/x.(ds/dt)
0	-	-	0,3609	-	0	0,00E+00
24	0,10	0,3609	0,3332	0	24	1,15E-02
48	0,65	0,3332	0,3270	24	48	3,97E-04
72	0,50	0,3270	0,3208	48	72	5,17E-04
96	0,35	0,3208	0,3146	72	96	7,38E-04
168	1,50	0,3146	0,3208	96	168	-5,74E-05
192	1,45	0,3208	0,3208	168	192	0,00E+00
216	2,30	0,3208	0,3270	192	216	-1,12E-04

Donde:

X: Concentración de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

qs: Rapidez especifica de consumo de sustrato (g/g.h).

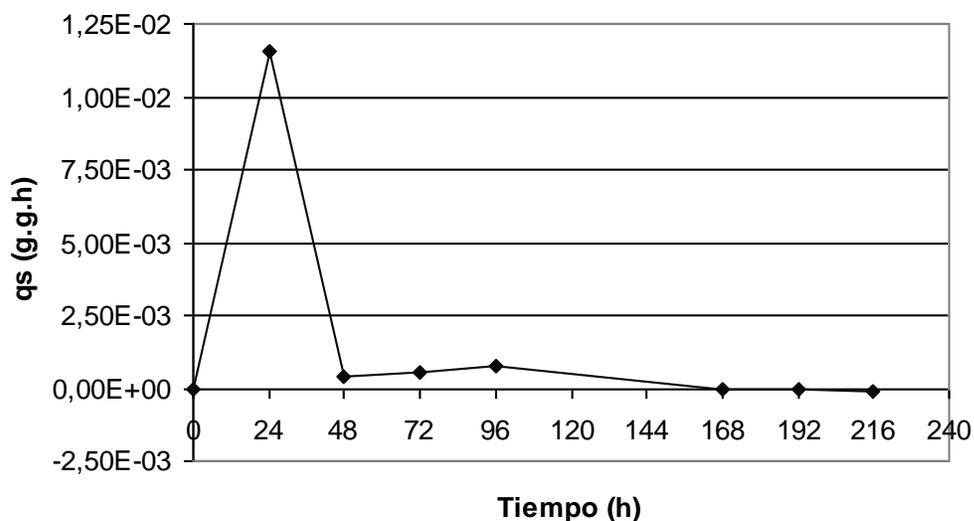


Figura N° 36: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 36 describe los gramos de sustrato (azúcares totales) que se consumen por cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de q_s se da a las 24 horas del proceso. q_s decae a las 48, a partir de este punto q_s experimenta un leve aumento que se mantiene hasta las 96 horas. Los valores negativos de q_s a las 168 y 216 horas se deben a que en esos puntos se experimenta un aumento en la concentración de azúcares, en dichos puntos se observa un aumento en la biomasa, por lo que es posible que haya consumo de sustrato, pero este no es medible debido a que según lo observado, la velocidad de liberación de azúcares de la celulosa es superior a la velocidad de consumo. A las 192 horas q_s es igual a cero, esto indica que en ese punto la concentración de azúcares se mantiene constante.

5.1.3.6. Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexo 24).

TABLA Nº 39: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	C Vit. B2 ($\mu\text{g/ml}$)	C Vit. B2 (g/L)
0	1,92	0,00192
24	2,06	0,00206
48	1,34	0,00134
72	1,18	0,00118
96	0,54	0,00054
168	0,72	0,00072
192	1,07	0,00107
216	1,07	0,00107

TABLA Nº 40: CALCULO DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA. ENSAYO 3

Pi	Pmax	Pp = Pmax - Pi	%Pp = (Pp/Pmax).100
0,00192	0,00206	0,00014	6,76

Donde:

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pmax: Concentración máxima de riboflavina observada (g/L).

Pp: Cantidad de riboflavina Producida (g/L).

%Pp: Porcentaje de producción de riboflavina (g/L).

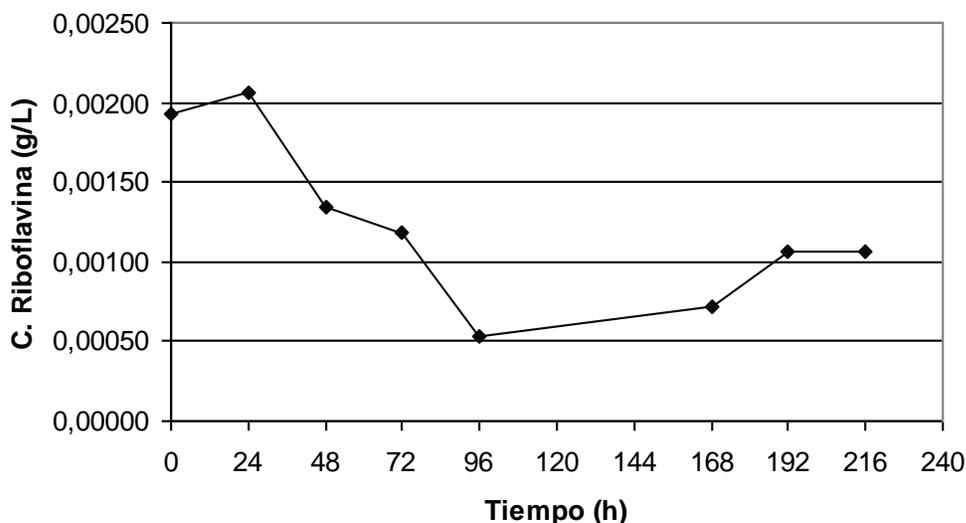


Figura N° 37: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 37 muestra la producción de Riboflavina a medida transcurre el tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa una producción por encima de la concentración inicial a las 24 horas. A partir de las 24 horas la concentración de riboflavina disminuye, y aumenta nuevamente después de las 96 horas, manteniendo un valor constante en el periodo de 192 a 216 horas. Sin embargo la producción observada entre las 96 y 192 horas no excede a la concentración inicial de vitamina (cero horas). Entonces tenemos que la máxima concentración de vitamina se da a las 24 horas del proceso de producción, dicha concentración representa un aumento porcentual en riboflavina de un 6.76 por ciento. El decremento observado en la concentración de riboflavina puede deberse a que la levadura podría estar utilizando la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático.

5.1.3.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

TABLA Nº 41: CALCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO (QP). ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Pi	Pf	ti	tf	QP = dp/dt
0	-	0,00192	-	0	0,00E+00
24	0,00192	0,00206	0	24	5,83E-06
48	0,00206	0,00134	24	48	-3,00E-05
72	0,00134	0,00118	48	72	-6,67E-06
96	0,00118	0,00054	72	96	-2,67E-05
168	0,00054	0,00072	96	168	2,50E-06
192	0,00072	0,00107	168	192	1,46E-05
216	0,00107	0,00107	192	216	0,00E+00

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

QP: Rapidez volumétrica de formación de producto (g/L.h).

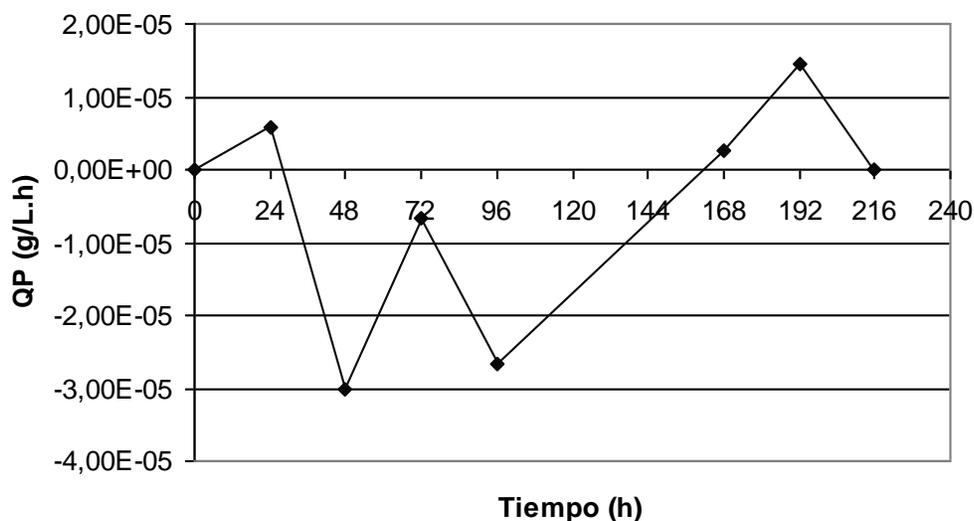


Figura N° 38: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3.

La figura N° 38 describe los gramos de Riboflavina que se producen por cada litro de medio de producción en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que la vitamina se produce con mayor velocidad a las 192 horas del proceso. Los valores negativos de QP indican que la levadura ha utilizado la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático, dándose la mayor velocidad de consumo a las 48 horas. QP toma un valor igual a cero cuando las concentraciones de vitamina se mantienen constantes.

5.1.3.8 Rapidez específica de formación de producto (qp).

TABLA Nº 42: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Xf	Pi	Pf	ti	tf	qp = 1/x.(dp/dt)
0	-	-	0,00192	-	0	0,00E+00
24	0,10	0,00192	0,00206	0	24	5,83E-05
48	0,65	0,00206	0,00134	24	48	-4,62E-05
72	0,50	0,00134	0,00118	48	72	-1,33E-05
96	0,35	0,00118	0,00054	72	96	-7,62E-05
168	1,50	0,00054	0,00072	96	168	1,67E-06
192	1,45	0,00072	0,00107	168	192	1,01E-05
216	2,30	0,00107	0,00107	192	216	0,00E+00

Donde:

X: Concentración de biomasa (g/L).

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de riboflavina (g/L).

ti: Tiempo inicial en horas (h).

tf: Tiempo final en horas (h).

qp: Rapidez específica de formación de producto (g/g.h).

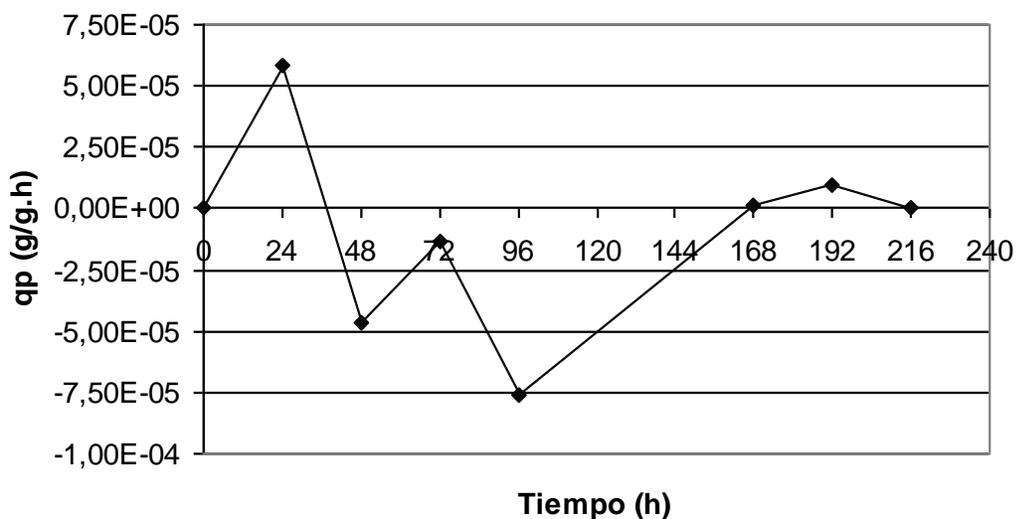


Figura N° 39: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 39 describe los gramos de riboflavina que se producen por cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de qp se da a las 24 horas. Los valores negativos de qp indican que la levadura ha utilizado la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina como cofactor enzimático, dándose el mayor consumo por gramo de biomasa las 96 horas. QP toma un valor igual a cero cuando las concentraciones de vitamina se mantienen constantes.

5.1.3.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

TABLA Nº 43: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	X_i	X_f	S_i	S_f	$Y_{x/s} = -dx/ds$
0	-	0,05	-	0,3609	0,0
24	0,05	0,10	0,3609	0,3332	1,8
48	0,10	0,65	0,3332	0,3270	88,7
72	0,65	0,50	0,3270	0,3208	-24,2
96	0,50	0,35	0,3208	0,3146	-24,2
168	0,35	1,50	0,3146	0,3208	-185,5
192	1,50	1,45	0,3208	0,3208	-
216	1,45	2,30	0,3208	0,3270	-137,1

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_f : Concentración final de biomasa (g/L).

S_i : Concentración inicial sustrato (g/L).

S_f : Concentración final de sustrato (g/L).

$Y_{x/s}$: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

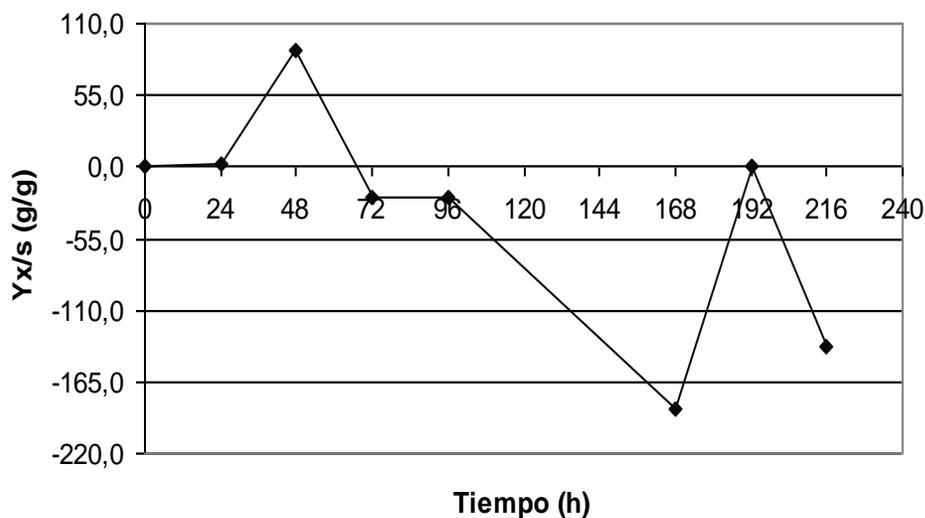


Figura Nº 40: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura Nº 40 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de $Y_{x/s}$ se da a las 48 horas del proceso, esto indica que en este punto es en donde se da la mayor conversión de sustrato en biomasa.

Los Valores negativos que presenta $Y_{x/s}$ a las 72 y 96 horas, se deben a que ha habido una disminución en la biomasa en dichos puntos, lo que indica que el sustrato consumido no es utilizado para generar material celular, si no que probablemente sea utilizado como fuente de energía para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula. Los Valores negativos que presenta $Y_{x/s}$ a las 168 y 216 horas, se deben a que en dichos puntos se presenta un aumento en la concentración de azúcares. No es posible cuantificar $Y_{x/s}$ a las 192 horas ya

que en este punto no hay consumo aparente de azúcares (la concentración de azúcares se mantiene constante).

5.1.3.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (Yp/s).

TABLA Nº 44: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Pi	Pf	Si	Sf	Yp/s = -dp/ds
0	-	0,00192	-	0,3609	0,00E+00
24	0,00192	0,00206	0,3609	0,3332	5,05E-03
48	0,00206	0,00134	0,3332	0,3270	-1,16E-01
72	0,00134	0,00118	0,3270	0,3208	-2,58E-02
96	0,00118	0,00054	0,3208	0,3146	-1,03E-01
168	0,00054	0,00072	0,3146	0,3208	-2,90E-02
192	0,00072	0,00107	0,3208	0,3208	-
216	0,00107	0,00107	0,3208	0,3270	0,00E+00

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

YP/s: Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (g/g).

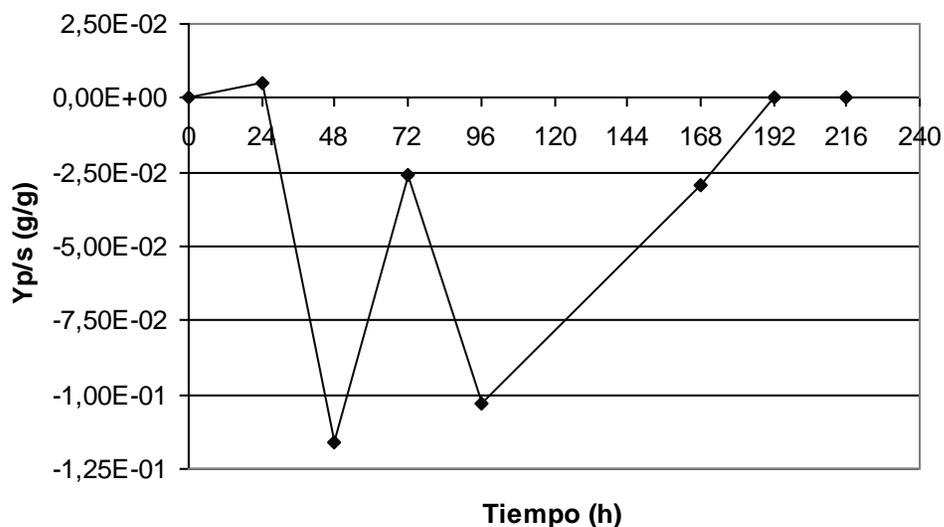


Figura N° 41: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 41 representa la eficacia de conversión del sustrato en producto. Dicho de otra forma, representa la cantidad de riboflavina formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que el mayor valor de Y_p/s se da a las 24 horas del proceso, esto indica que en este punto es donde se da la mayor conversión de sustrato vitamina.

Los Valores negativos que presenta Y_p/s entre las 48 y 96 horas, se deben a que en dicho periodo se experimenta una disminución en la concentración de Riboflavina, lo cual indica que el sustrato consumido entre estos puntos no es utilizado para la producción de vitamina. No es posible cuantificar Y_x/s a las 192 horas ya que en este punto no hay consumo aparente de azúcares (la concentración de azúcares se mantiene constante).

El valor negativo que presenta Yp/s a las 168 horas se debe a que en este punto se experimenta un aumento en la concentración de sustrato, es posible que haya consumo de sustrato en este punto ya que en este se experimenta un aumento en la concentración de vitamina, sin embargo este consumo no es medible, posiblemente debido a que la velocidad de liberación de azúcares de la celulosa supera a la velocidad de consumo.

Yp/s presenta un valor de cero a las 216 horas, esto se debe a que la concentración de vitamina se mantiene constante en dicho punto (no hay producción de vitamina).

5.1.3.11 Determinación de pH.

Los resultados que se presentan en la siguiente tabla son el promedio de los datos obtenidos al realizar mediciones de pH por triplicado a cada una de las muestras recolectadas a lo largo del proceso (Anexo 27).

TABLA N° 45: RESULTADOS DE LA MEDICION DEL PH. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	pH
0	4,14
24	3,53
48	3,58
72	3,70
96	3,86
168	3,26
192	3,10
216	3,14

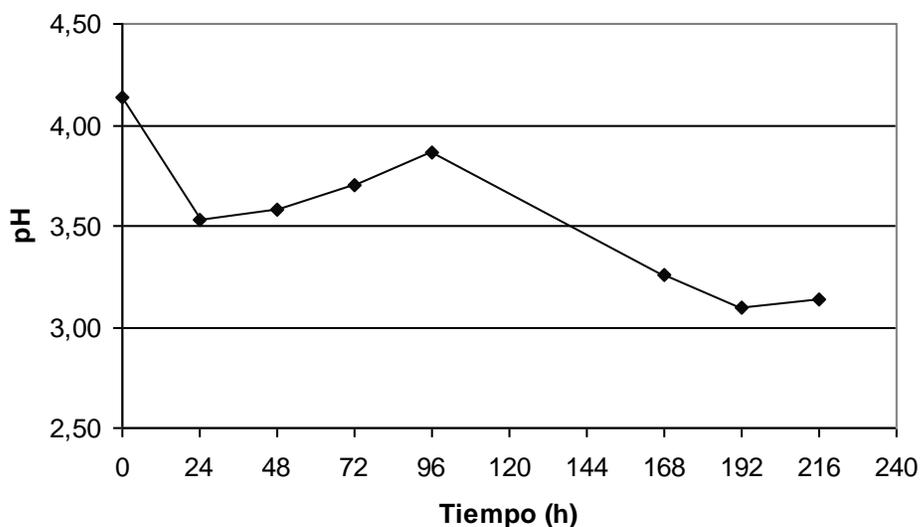


Figura N° 42: Gráfica de pH Vrs Tiempo. Ensayo 3.

La figura N° 42 muestra las variaciones de pH a lo largo del proceso fermentativo, dichas variaciones se deben a que la composición química del medio de cultivo se encuentra en constante cambio, consecuencia del consumo de sustrato y la generación de productos propios de los procesos fermentativos (producción de etanol). En la gráfica podemos observar que el pH oscila entre 3.10 y 3.86, estos valores se encuentran dentro del intervalo óptimo requerido para el crecimiento de levaduras (3 – 6).

5.2 Comparación de los resultados obtenidos a partir de datos experimentales de 3 ensayos de cinética de crecimiento para la producción de riboflavina.

5.2.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

TABLA N° 46: RESULTADOS DE 3 ENSAYOS PARA EL ANALISIS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO POR EL METODO DEL PESO SECO.

	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	LnX	Biomasa (g/L)	LnX	Biomasa (g/L)	LnX
0	0,05	-3,00	0,05	-3,00	0,05	-3,00
24	0,20	-1,61	0,35	-1,05	0,10	-2,30
48	0,20	-1,61	0,95	-0,05	0,65	-0,43
72	0,35	-1,05	0,80	-0,22	0,50	-0,69
96	2,50	0,92	1,25	0,22	0,35	-1,05
168	1,45	0,37	1,35	0,30	1,50	0,41
192	1,20	0,18	1,05	0,05	1,45	0,37
216	1,80	0,59	1,10	0,10	2,30	0,83

TABLA N° 47: CONCENTRACIONES MAXIMAS Y GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA OBTENIDOS EN 3 ENSAYOS.

	Tiempo (h)	Conc. Máxima de Biomasa (g/L)	Generación porcentual de biomasa (%)
Ensayo 1	96	2,50	98,00
Ensayo 2	168	1,35	96,30
Ensayo 3	216	2,30	97,83

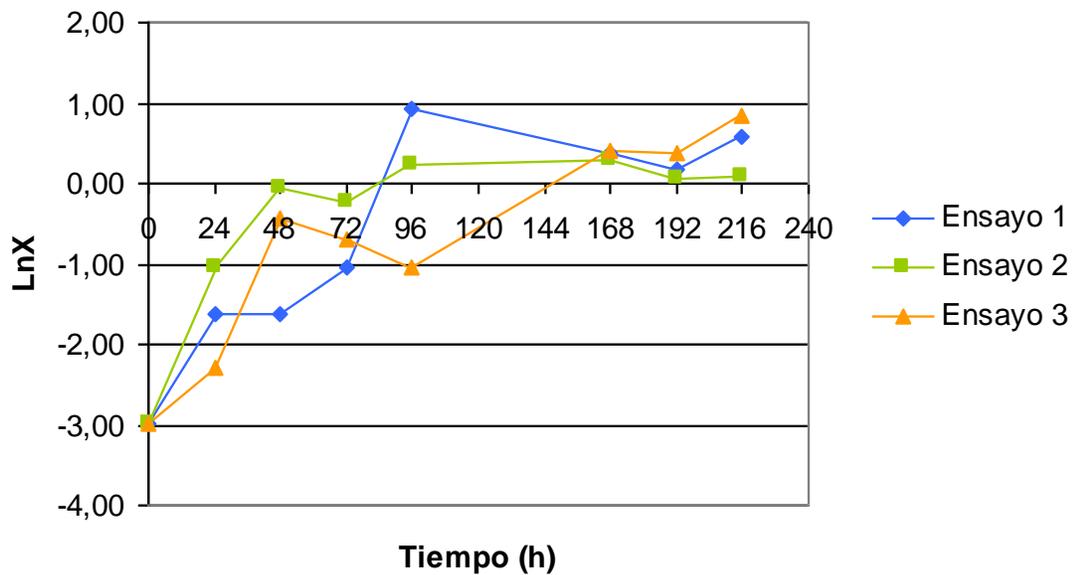


Figura N° 43: Gráfica de LnX Vrs Tiempo. 3 ensayos comparados.

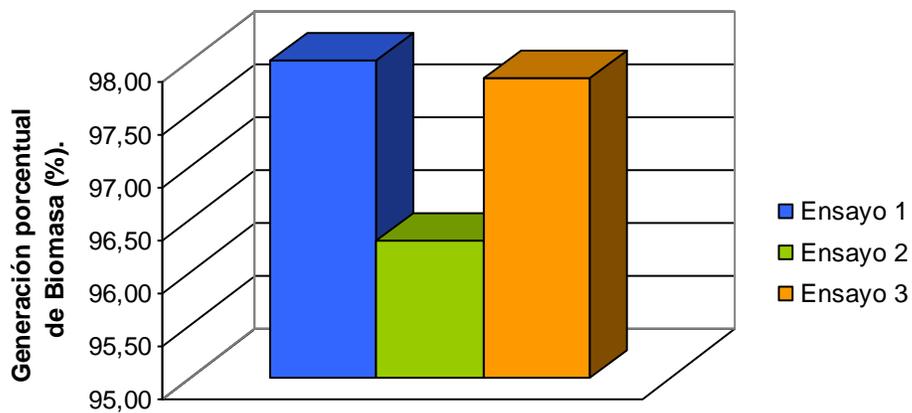


Figura N° 44: Gráfico comparativo de generación porcentual de biomasa para 3 ensayos.

En la figura N° 44 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas en 3 ensayos, comparando dichas curvas se observa que el máximo de biomasa del ensayo 3 (216 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 2 (168 horas) y de los 3 ensayos la mayor cantidad de biomasa se obtiene en el ensayo 1 (96 horas). Las diferencias en la generación de biomasa entre cada uno de los 3 ensayos se aprecian mejor en la figura N° 44, la cual nos muestra la generación de biomasa en términos de porcentaje para cada ensayo.

5.2.2 Rapidez específica de crecimiento (μ).

TABLA N° 48: RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	μ (1/h)	μ (1/h)	μ (1/h)
0	0,0000	0,0000	0,0000
24	0,0578	0,0811	0,0289
48	0,0000	0,0416	0,0780
72	0,0233	-0,0072	-0,0109
96	0,0819	0,0186	-0,0149
168	-0,0076	0,0011	0,0202
192	-0,0079	-0,0105	-0,0014
216	0,0169	0,0019	0,0192

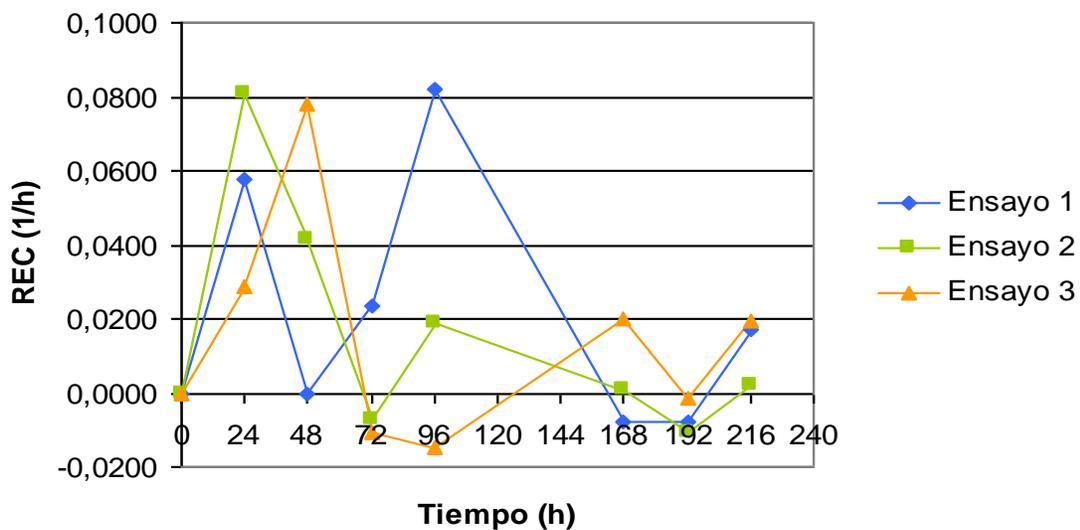


Figura Nº 45: Gráfica de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura Nº 45 se muestran las gráficas que representan las variaciones de la rapidez específica de crecimiento en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de μ del ensayo 2 (24 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 3 (48 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de μ se obtiene en el ensayo 1 (96 horas).

5.2.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

TABLA Nº 49: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE AZÚCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL - SULFÚRICO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	C. Sustrato (g/L)	C. Sustrato (g/L)	C. Sustrato (g/L)
0	0,3486	0,3547	0,3609
24	0,2653	0,2036	0,3332
48	0,2807	0,3270	0,3270
72	0,2591	0,2745	0,3208
96	0,2375	0,2653	0,3146
168	0,2036	0,2190	0,3208
192	0,2283	0,2499	0,3208
216	0,2314	0,2221	0,3270

TABLA Nº 50: MINIMOS Y CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACION DE AZÚCARES TOTALES PARA 3 ENSAYOS.

	Tiempo (h)	Conc. mínima de sustrato (g/L)	Consumo porcentual de sustrato (%)
Ensayo 1	168	0,2036	41,59
Ensayo 2	24	0,2036	42,61
Ensayo 3	96	0,3146	12,82

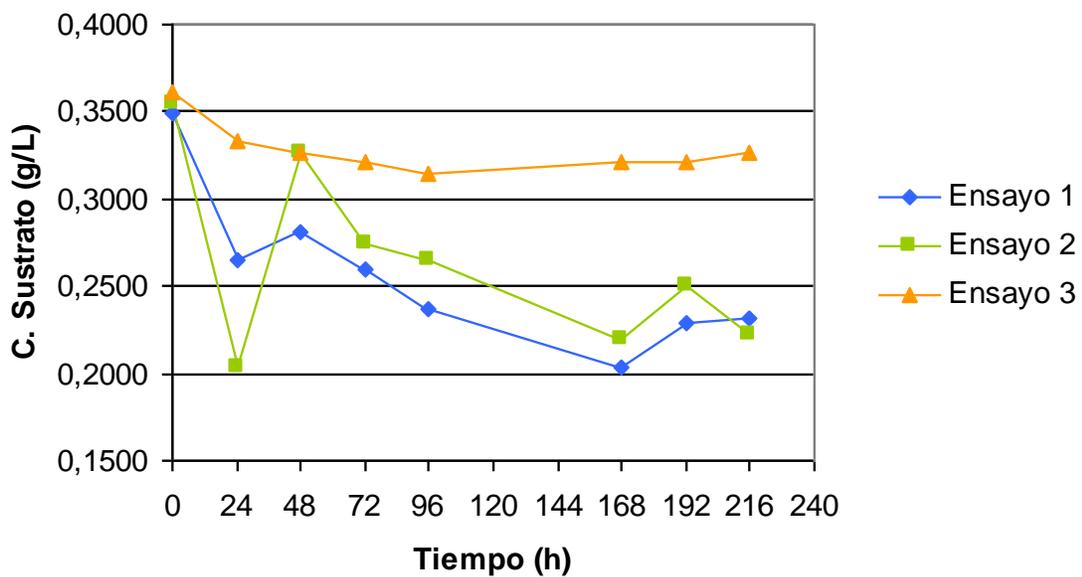


Figura Nº 46: Gráfica de concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

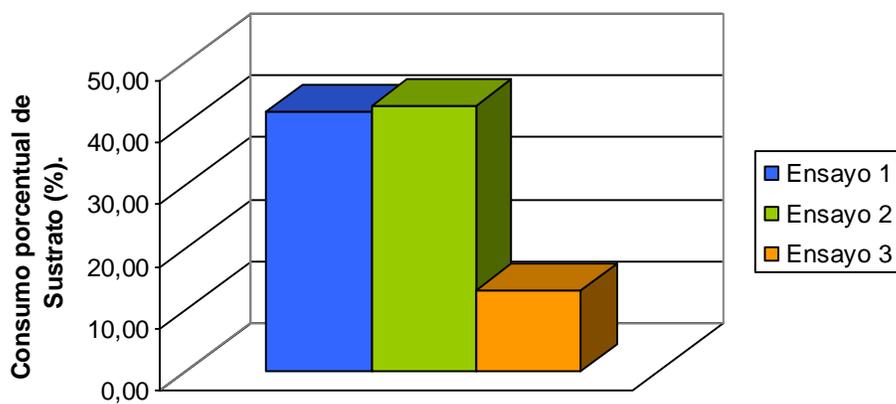


Figura Nº 47: Gráfico comparativo de consumo porcentual de sustrato para 3 ensayos.

En la figura N° 46 se muestran las gráficas que representan el consumo de sustrato en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que la tendencia del consumo de sustrato es similar en los ensayos 1 y 2, en el ensayo 3 se observa que el sustrato se consume en menor proporción en relación a los ensayos 1 y 2. Las diferencias en el consumo de sustrato entre cada uno de los 3 ensayos se aprecian mejor en la figura N° 47, la cual nos muestra el consumo de sustrato en términos de porcentaje para cada ensayo.

5.2.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

TABLA N° 51: RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	QS (g/L.h)	QS (g/L.h)	QS (g/L.h)
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
24	3,47E-03	6,30E-03	1,15E-03
48	-6,42E-04	-5,14E-03	2,58E-04
72	9,00E-04	2,19E-03	2,58E-04
96	9,00E-04	3,83E-04	2,58E-04
168	4,71E-04	6,43E-04	-8,61E-05
192	-1,03E-03	-1,29E-03	0,00E+00
216	-1,29E-04	1,16E-03	-2,58E-04

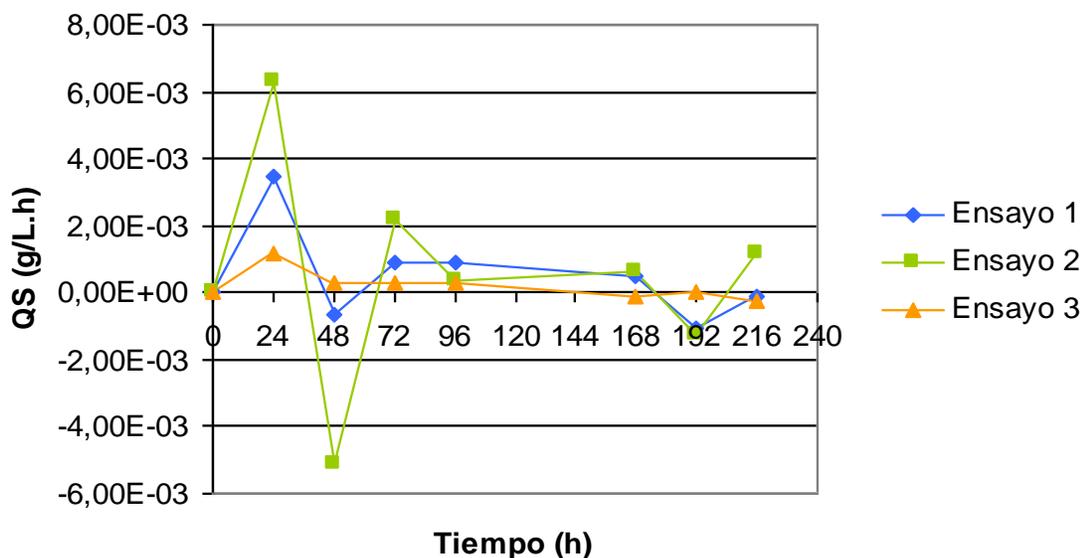


Figura N° 48: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura N° 48 se muestran las gráficas que representan las variaciones de la rapidez volumétrica de consumo de sustrato en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de QS del ensayo 1 (24 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 3 (24 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de QS se obtiene en el ensayo 2 (24 horas). La tendencia de las gráficas "QS Vrs Tiempo" de los 3 ensayos es similar.

5.2.5 Rapidez especifica de consumo de sustrato (qs).

TABLA Nº 52: RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	qs (g/g.h)	qs (g/g.h)	qs (g/g.h)
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
24	1,74E-02	1,80E-02	1,15E-02
48	-3,21E-03	-5,41E-03	3,97E-04
72	2,57E-03	2,73E-03	5,17E-04
96	3,60E-04	3,07E-04	7,38E-04
168	3,25E-04	4,76E-04	-5,74E-05
192	-8,58E-04	-1,23E-03	0,00E+00
216	-7,18E-05	1,05E-03	-1,12E-04

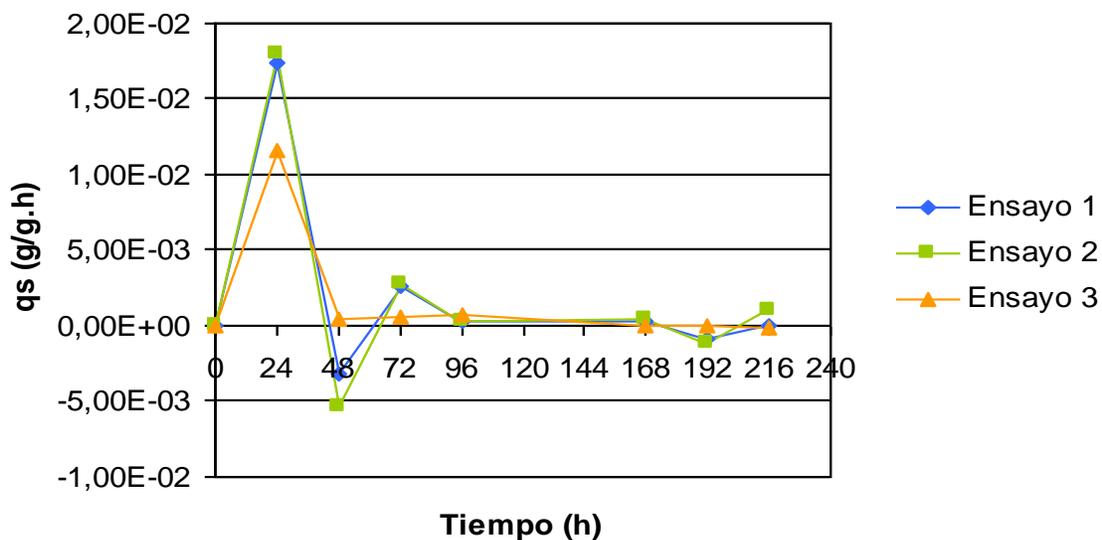


Figura Nº 49: Gráfica de rapidez especifica de consumo de sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura N° 49 se muestran las gráficas que representan las variaciones de la rapidez específica de consumo de sustrato en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de q_s del ensayo 1 (24 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 3 (24 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de q_s se obtiene en el ensayo 2 (24 horas). La tendencia de las gráficas " q_s Vrs Tiempo" de los 3 ensayos es similar.

5.2.6. Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

TABLA N° 53: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	C Vit. B2 (g/L)	C Vit. B2 (g/L)	C Vit. B2 (g/L)
0	0,00187	0,00192	0,00192
24	0,00196	0,00212	0,00206
48	0,00177	0,00163	0,00134
72	0,00196	0,00123	0,00118
96	0,00177	0,00140	0,00054
168	0,00136	0,00165	0,00072
192	0,00141	0,00128	0,00107
216	0,00152	0,00160	0,00107

TABLA Nº 54: CONCENTRACIONES MAXIMAS Y PORCENTAJES DE PRODUCCION OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA PARA 3 ENSAYOS.

	Tiempo (h)	Conc. Máxima de Riboflavina (g/L)	Porcentaje de producción (%)
Ensayo 1	24/72	0,00196	4,46
Ensayo 2	24	0,00212	9,12
Ensayo 3	24	0,00206	6,76

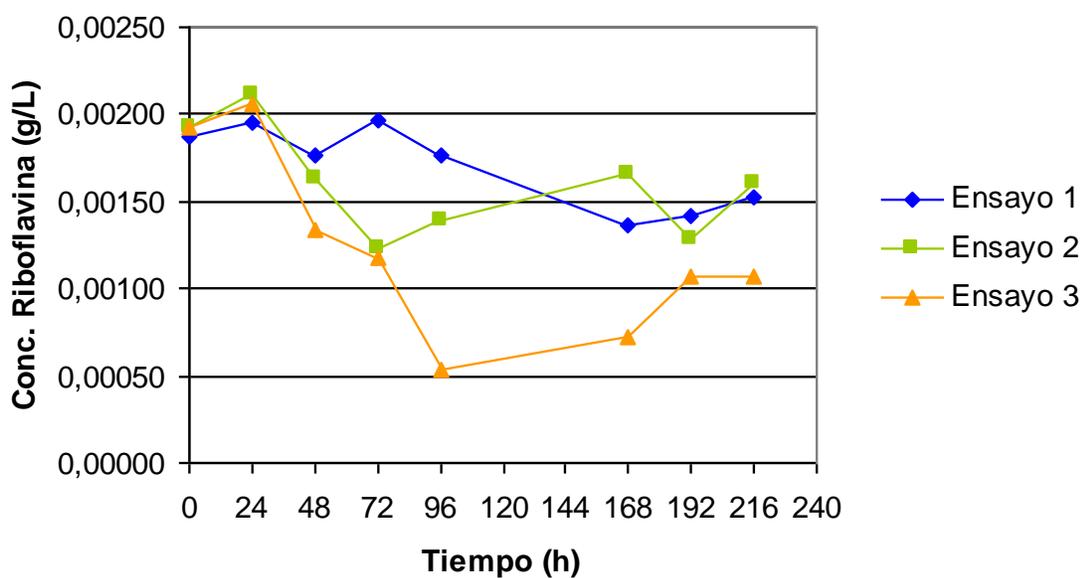


Figura Nº 50: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

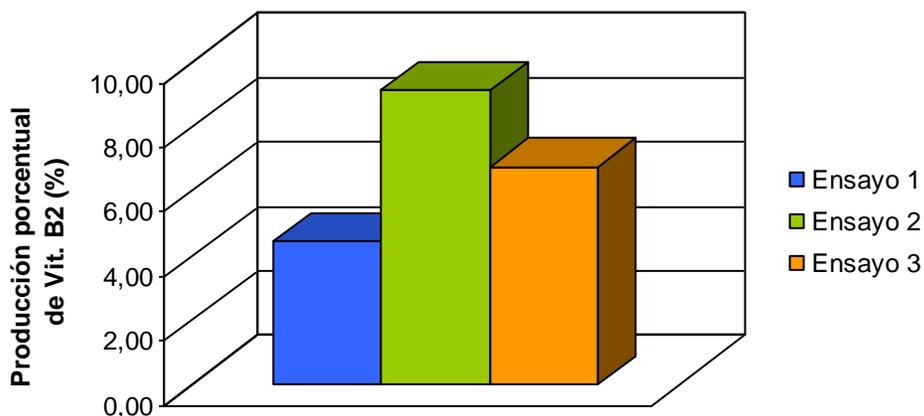


Figura N° 51: Gráfico comparativo de porcentaje de producción de riboflavina para 3 ensayos.

En la figura N° 51 se muestran las gráficas que representan la producción de Riboflavina en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de riboflavina del ensayo 3 (24 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 1 (24 horas) y de los 3 ensayos la mayor concentración de riboflavina se obtiene en el ensayo 2 (24 horas). Las diferencias en la formación de producto entre cada uno de los 3 ensayos se aprecian mejor en la figura N° 51, la cual nos muestra la producción de riboflavina en términos de porcentaje para cada ensayo.

5.2.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

TABLA Nº 55: RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO (QP) PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	QP (g/L.h)	QP (g/L.h)	QP (g/L.h)
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
24	3,75E-06	8,33E-06	5,83E-06
48	-7,92E-06	-2,04E-05	-3,00E-05
72	7,92E-06	-1,67E-05	-6,67E-06
96	-7,92E-06	7,08E-06	-2,67E-05
168	-5,69E-06	3,47E-06	2,50E-06
192	2,08E-06	-1,54E-05	1,46E-05
216	4,58E-06	1,33E-05	0,00E+00

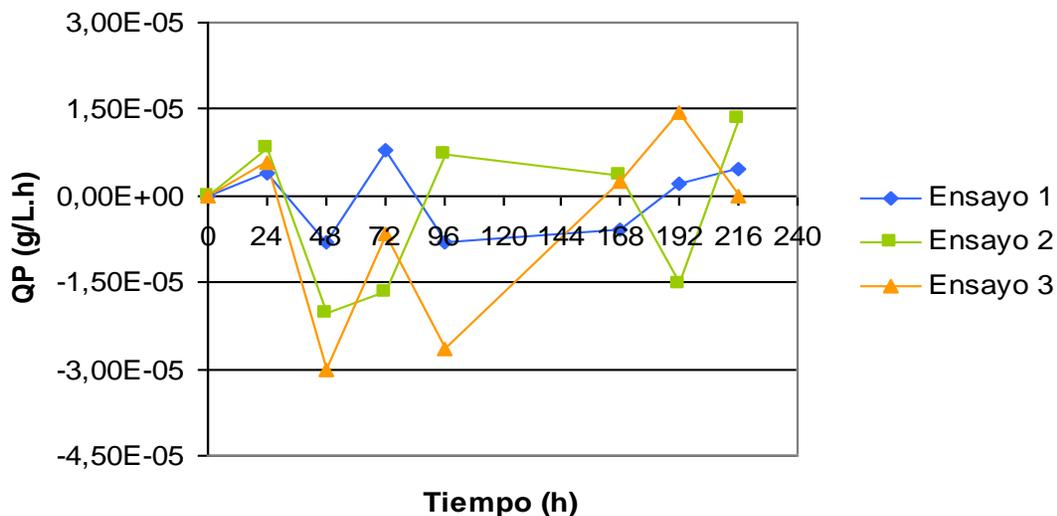


Figura Nº 52: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura N° 52 se muestran las gráficas que representan las variaciones de la rapidez volumétrica de formación de producto en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de QP del ensayo 3 (24 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 1 (24 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de QP se obtiene en el ensayo 2 (24 horas).

5.2.8 Rapidez específica de formación de producto (qp).

TABLA N° 56: RESULTADOS DEL CÁLCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	qp (g/g.h)	qp (g/g.h)	qp (g/g.h)
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
24	1,88E-05	2,38E-05	5,83E-05
48	-3,96E-05	-2,15E-05	-4,62E-05
72	2,26E-05	-2,08E-05	-1,33E-05
96	-3,17E-06	5,67E-06	-7,62E-05
168	-3,93E-06	2,57E-06	1,67E-06
192	1,74E-06	-1,47E-05	1,01E-05
216	2,55E-06	1,21E-05	0,00E+00

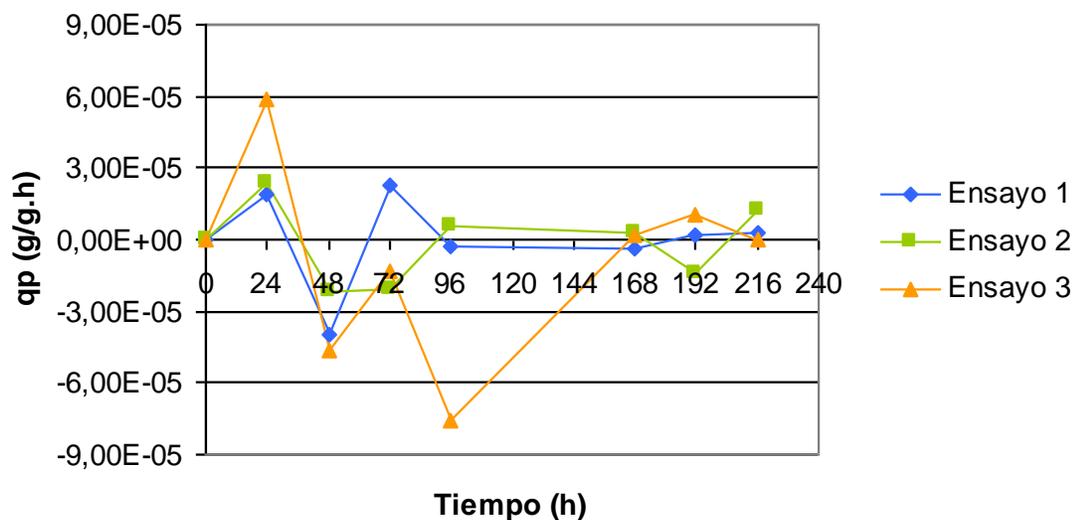


Figura N° 53: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura N° 53 se muestran las gráficas que representan las variaciones de la rapidez específica de formación de producto en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de qp del ensayo 2 (24 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 1 (24 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de qp se obtiene en el ensayo 3 (24 horas).

5.2.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

TABLA Nº 57: RESULTADOS DEL CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)
0	0,0	0,0	0,0
24	1,8	2,0	1,8
48	0,0	-4,9	88,7
72	6,9	-2,9	-24,2
96	99,5	48,9	-24,2
168	-31,0	2,2	-185,5
192	10,1	9,7	-
216	-193,5	1,8	-137,1

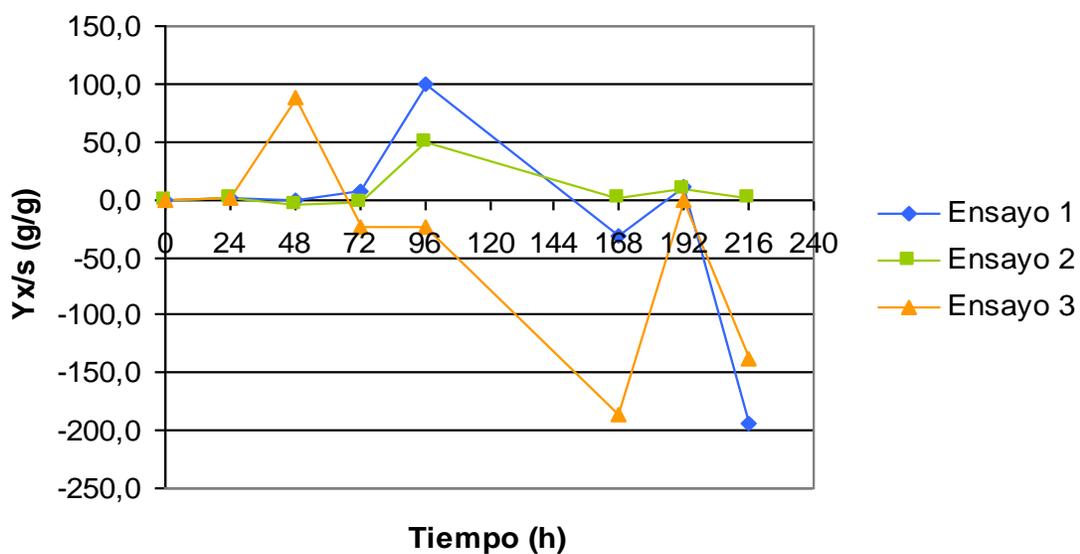


Figura Nº 54: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura N° 54 se muestran las gráficas que representan la eficacia de conversión de sustrato en biomasa en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de $Y_{x/s}$ del ensayo 3 (48 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 2 (96 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de $Y_{x/s}$ se obtiene en el ensayo 1 (96 horas).

5.2.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$).

TABLA N° 58: RESULTADOS DEL CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
24	1,08E-03	1,32E-03	5,05E-03
48	1,23E-02	3,97E-03	-1,16E-01
72	8,80E-03	-7,62E-03	-2,58E-02
96	-8,80E-03	1,85E-02	-1,03E-01
168	-1,21E-02	5,40E-03	-2,90E-02
192	-2,02E-03	1,20E-02	-
216	-3,55E-02	1,15E-02	0,00E+00

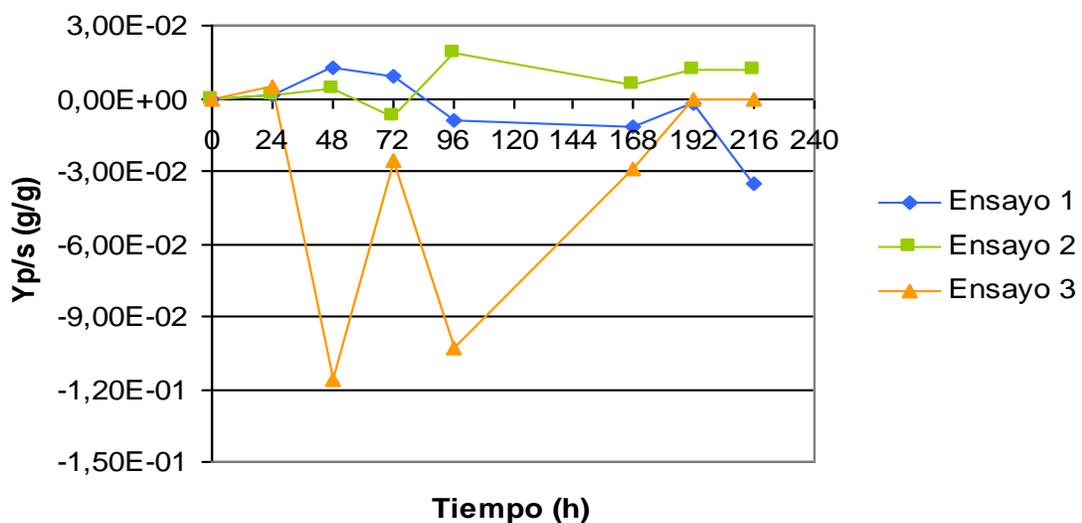


Figura Nº 55: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura Nº 55 se muestran las gráficas que representan la eficacia de conversión de sustrato en riboflavina en 3 ensayos, comparando dichas gráficas se observa que el máximo de $Y_{p/s}$ del ensayo 1 (72 horas) es mayor que el máximo obtenido en el ensayo 3 (24 horas) y de los 3 ensayos el mayor valor de $Y_{p/s}$ se obtiene en el ensayo 2 (96 horas).

5.2.11 Determinación de pH.

TABLA Nº 59: RESULTADOS DE LA MEDICION DE PH PARA 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	pH	pH	pH
0	4,01	3,93	4,14
24	3,63	4,12	3,53
48	4,17	3,38	3,58
72	3,73	3,27	3,70
96	4,66	3,48	3,86
168	4,49	3,37	3,26
192	4,35	3,61	3,10
216	3,81	3,57	3,14

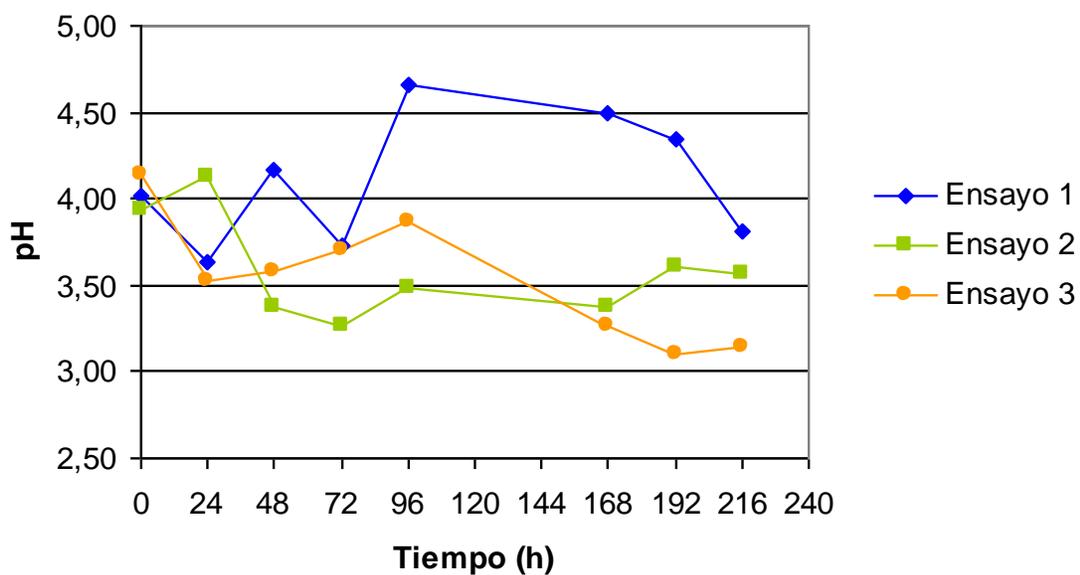


Figura Nº 56: Gráfica de pH Vrs Tiempo. 3 ensayos comparados.

En la figura N° 56 se muestran las gráficas que representan las variaciones del pH en 3 ensayos a lo largo del proceso fermentativo, en donde el mayor valor observado es de 4.66 (ensayo 1; 96 horas) y el menor de 3.10 unidades de pH (ensayo 3; 192 horas). Entonces, tenemos que el pH a lo largo del proceso se mantiene dentro del intervalo óptimo para el crecimiento de levaduras (3 - 6). Estas variaciones de pH se deben a cambios en la composición del medio de producción como consecuencia del consumo de sustrato y de la generación de productos propios de los procesos fermentativos. Así por ejemplo tenemos que los aumentos de pH pueden deberse a la producción de etanol (producto del crecimiento aerobio), mientras que las disminuciones de pH son resultado del consumo de compuestos orgánicos nitrogenados de carácter básico, de modo que cuando se consume el nitrógeno de dichos compuestos (proteínas por ejemplo) se deja un protón en el medio lo cual causa que el pH disminuya. (7)

5.3 Idealización del comportamiento de la cinética de crecimiento y producción de riboflavina durante el proceso fermentativo.

Como se observa en el capítulo 5.1, al aplicar las ecuaciones cinéticas a los resultados experimentales se obtienen datos en cuyos gráficos pueden observarse puntos de inflexión que presentan signos falsos positivos o falsos negativos, esto se debe a la variabilidad de los procesos naturales, lo cual no permite una clara visualización de los parámetros en estudio a lo largo del proceso. Por esta razón para interpretar los resultados obtenidos se tomarán

como referencia los datos obtenidos a partir de las idealizaciones de los datos experimentales (corrección o ajuste de datos a la tendencia teórica) ya que estos ofrecen una visión mas clara y simple de los parámetros en estudio y permiten ofrecer un modelo matemático de la cinética de crecimiento y proceso de producción de la riboflavina.

En las idealizaciones (ver capítulo 3.10) que a continuación se presentan se hace uso de modelos diagramáticos (gráficas que representan los parámetros cinéticos en estudio) y matemáticos (ecuaciones de las gráficas que describen matemáticamente los parámetros cinéticos). Dichos modelos se realizan en función de los datos obtenidos experimentalmente, de manera que se ajusten lo mejor posible a la tendencia teórica o esperada del parámetro en estudio, eliminando en el mayor grado posible las variables que generan ruido en el sistema, utilizando para ello las funciones matemáticas que mejor representen las relaciones observadas experimentalmente (regresiones polinomiales, exponenciales, lineales, de potencia, etc).

Para la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente durante el proceso de producción de riboflavina, se hizo uso del programa Equation Grapher Versión 3.2 1996-1998 (MFSoft Internacional). Este es un paquete de dos programas integrados: Analizador de la regresión y gráficador de la ecuación. El analizador de la regresión es un programa que maneja modelos usuales de regresión tales como lineal, logarítmica y exponencial. También proporciona modelos polinómicos y regresiones múltiples. El programa

gráficador de la ecuación traza y analiza las curvas obtenidas en el programa analizador de la regresión, encuentra automáticamente tangentes, raíces, máximos y mínimos, etc. El programa es útil porque gráfica rectas tangentes cuyas pendientes representan velocidades en diferentes tiempos.

5.3.1 Idealización del ensayo 1 (Sin aditivos).

5.3.1.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

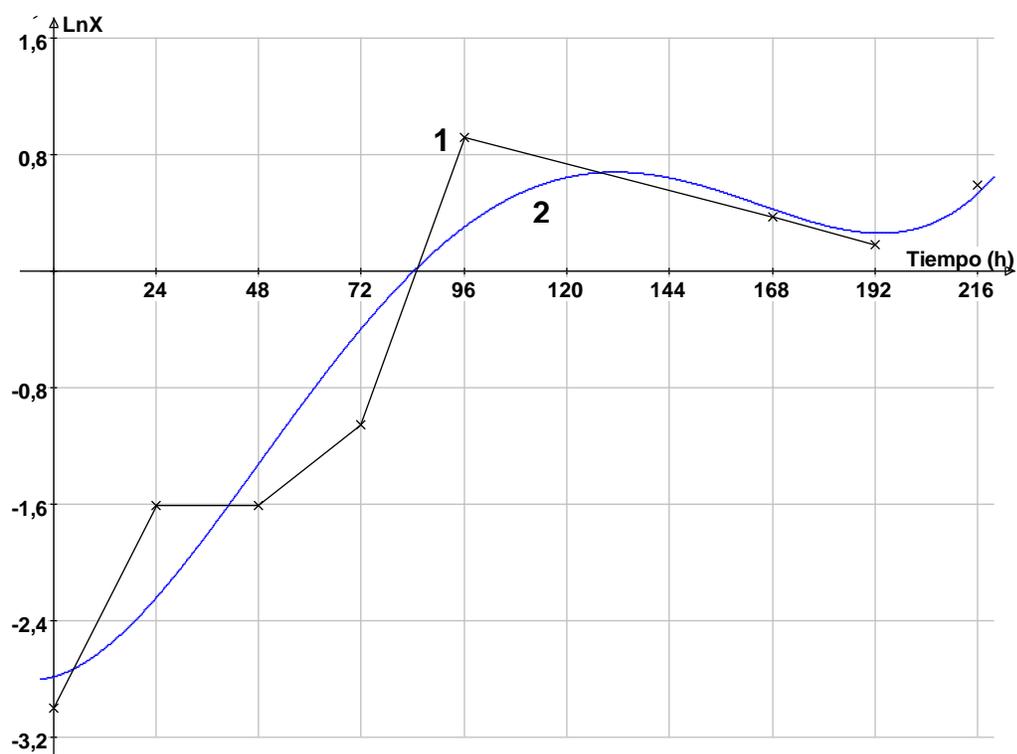


Figura Nº 57: Regresión polinomial de Gráfica LnX Vrs Tiempo. Ensayo 1.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 57 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indican sus máximos y mínimos (círculos rojos).

Dicha curva es representada por la ecuación:

$$y = -2,78 + 0,00833x + 0,000749x^2 - 6,74E-6x^3 + 1,58E-8x^4$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla N° 60.

TABLA N° 60: RESULTADOS DE BIOMASA OBTENIDOS POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	LnX	Biomasa (g/L)
0	-2,780	0,062
24	-2,237	0,107
48	-1,316	0,268
72	-0,389	0,678
96	0,301	1,352
120	0,635	1,887
130,36	0,666	1,946
144	0,619	1,857
168	0,387	1,472
192	0,197	1,218
194,76	0,194	1,214
216	0,434	1,544

TABLA N° 61: CALCULO DE GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 1.

X_i	X_{max}	X_p = X_{max} - X_i	%X_p = (X_p/X_{max}).100
0,062	1,946	1,884	96,81

Donde:

X_i: Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_{max}: Concentración máxima de biomasa (g/L).

X_p: Cantidad de biomasa generada (g/L).

%X_p: Generación porcentual de biomasa (%).

La curva 2 de la figura N° 57 muestra el comportamiento que experimenta la generación de biomasa a lo largo del proceso fermentativo. En dicha curva, se observa que la biomasa va en aumento desde las cero horas y alcanza una concentración máxima a las 130.36 horas, dicha concentración representa un aumento porcentual en biomasa de un 96.81 por ciento. La biomasa disminuye en el periodo comprendido entre las 130.36 y las 194.76 horas, aumentando nuevamente después de este periodo. Dado lo anterior y si consideramos que la biomasa es aproximadamente constante entre las 120 y 144 horas, podemos identificar en la gráfica cuatro fases características del crecimiento microbiano en un cultivo por lotes, entonces tenemos que la fase de crecimiento se da en el periodo comprendido de cero a 120 horas del proceso, la fase estacionaria se

observa entre las 120 y 144 horas, las fase de muerte se da entre las 144 y 194.76 horas, y finalmente se observa una fase de crecimiento crítico a partir de las 194.76 horas.

5.3.1.2 Rapidez especifica de crecimiento (μ).

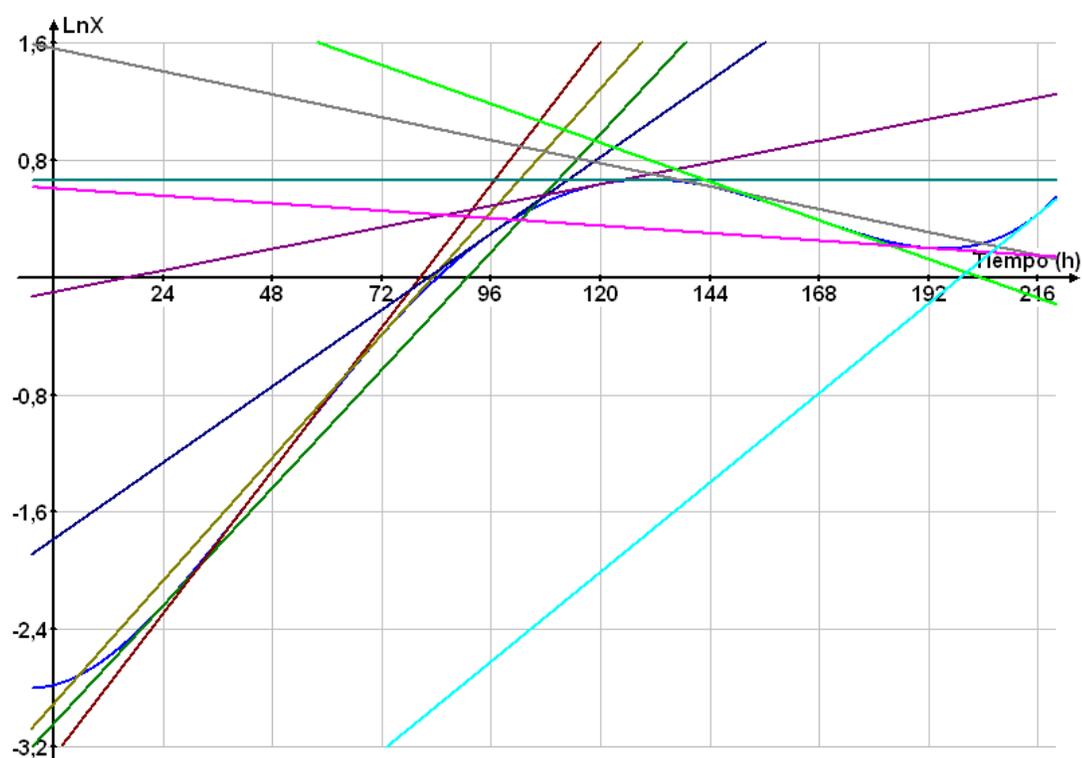


Figura N° 58: Rectas tangentes a la curva idealizada " $\ln X$ Vrs tiempo".
Ensayo 1.

La figura N° 58 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada " $\ln X$ Vrs tiempo" (curva 2; figura N° 57), en donde las pendientes de dichas rectas representan la rapidez especifica de crecimiento en un punto especifico a lo largo del proceso.

TABLA Nº 62: RESULTADOS DE RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA Nº 58.

Tiempo (h)	μ (1/h)
24	0,0335
48	0,0406
72	0,0350
96	0,0217
120	0,0061
130,36	0,0000
144	-0,0065
168	-0,0110
192	-0,0021
194,76	0,0000
216	0,0254

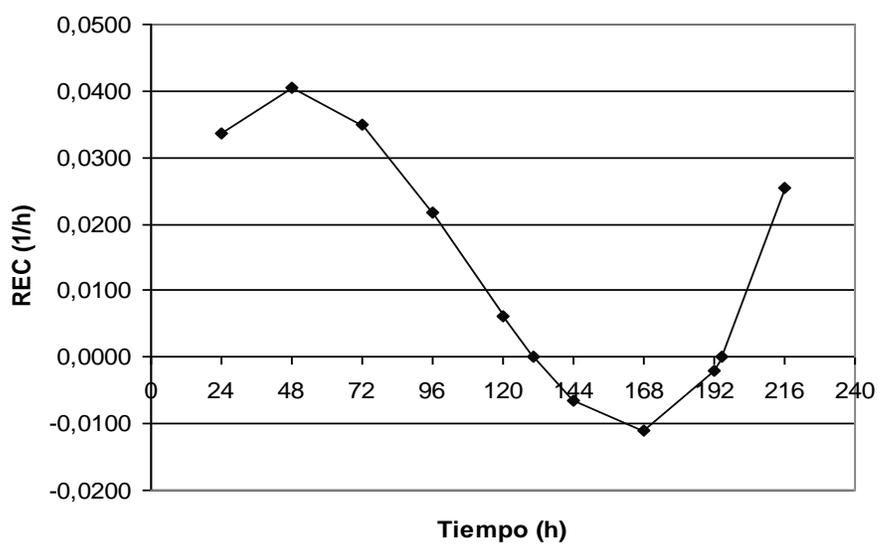


Figura Nº 59: Gráfico de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.

En la Figura N° 59 se observan las variaciones de la rapidez específica de crecimiento a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que la mayor tasa de crecimiento por unidad de tiempo se da a las 48 horas, este punto corresponde al inicio de la fase de crecimiento. Los valores negativos de μ indican que la velocidad de lisis celular supera a la velocidad de generación de células y por tanto estos puntos se encuentran dentro de la fase de muerte. μ es igual a cero en los puntos donde la curva 2 de la figura N° 57 presenta sus máximos y mínimos, en estos puntos la velocidad de lisis celular es igual a la velocidad de generación celular, lo que indica que la biomasa se mantiene aproximadamente constante en los puntos cercanos a las rectas tangentes a los máximos y mínimos.

5.3.1.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

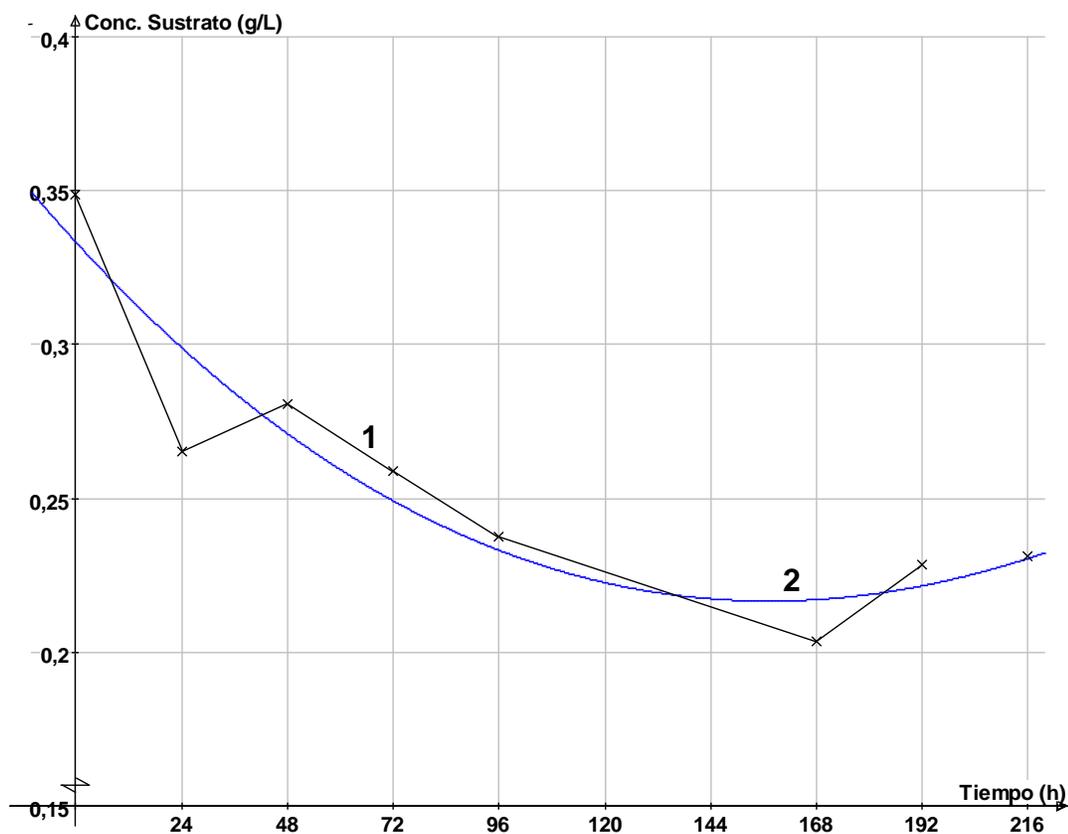


Figura Nº 60: Regresión polinomial de Gráfica Concentración de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 60 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indica el valor mínimo de concentración de sustrato (circulo rojo). Dicha gráfica es representada por la ecuación:

$$y = 0,333 - 0,00156x + 5,75E-6x^2 - 3,27E-9x^3$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla N° 63.

TABLA N° 63: RESULTADOS DE AZÚCARES TOTALES OBTENIDOS POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)
0	0,3330
24	0,2988
48	0,2710
72	0,2493
96	0,2333
120	0,2229
144	0,2178
156,56	0,2172
168	0,2177
192	0,2223
216	0,2314

TABLA N° 64: CALCULO DEL CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 1.

Si	Smin	Sc = Si - Smin	%Sc = (Sc/Si).100
0,3330	0,2172	0,1158	34,79

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Smin: Concentración mínima de sustrato observada (g/L).

Sc: Cantidad de sustrato consumido (g/L).

%Sc: Consumo porcentual de sustrato (%).

La curva 2 de la figura N° 60 muestra el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato a lo largo del proceso, en dicha curva se observa que la concentración de sustrato va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar una concentración mínima a las 156.56 horas del proceso, lo cual representa un consumo del 34.79 por ciento del sustrato. A partir de las 156.56 horas se observa un incremento en la concentración de sustrato, lo cual se debe al efecto de la liberación de azúcares de la celulosa.

5.3.1.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

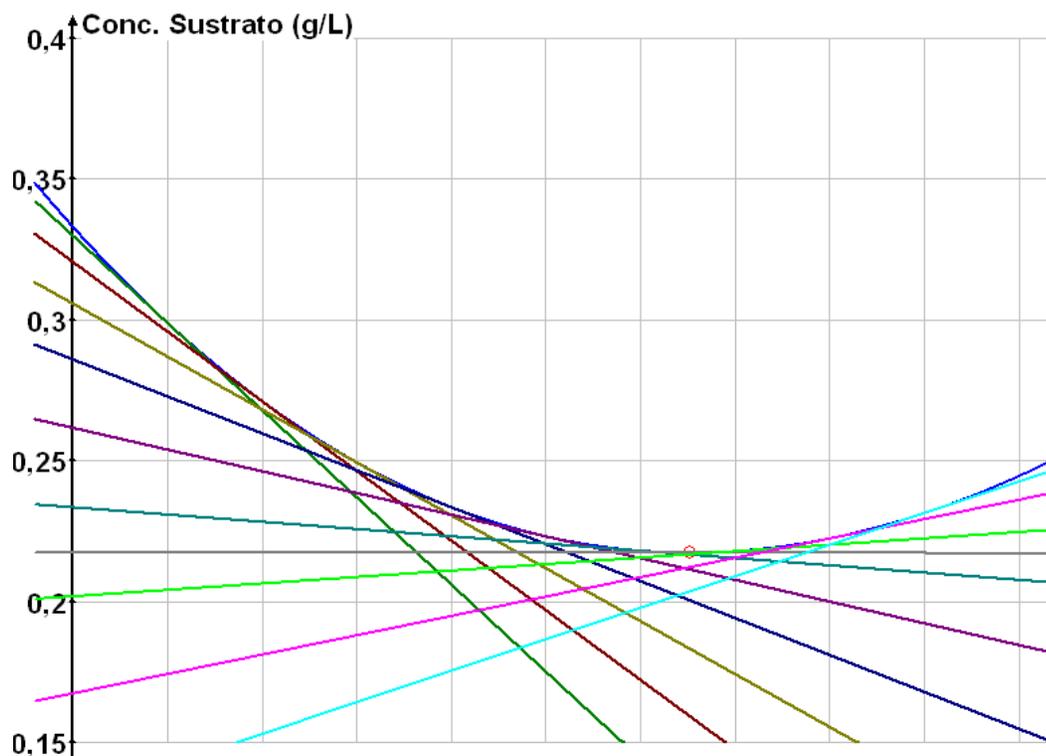


Figura N° 61: Rectas tangentes a la curva idealizada "Concentración de sustrato Vrs tiempo". Ensayo 1.

La figura N° 61 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada "concentración de sustrato Vrs tiempo" (curva 2: figura N° 60), en donde el negativo de las pendientes de dichas rectas representan la rapidez volumétrica de consumo de sustrato en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 65: RESULTADOS DE RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 61.

Tiempo (h)	m	QS = -m
24	-0,001290	0,001290
48	-0,001030	0,001030
72	-0,000783	0,000783
96	-0,000546	0,000546
120	-0,000321	0,000321
144	-0,000107	0,000107
156,56	0,000000	0,000000
168	0,000095	-0,000095
192	0,000286	-0,000286
216	0,000466	-0,000466

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada consumo de sustrato Vrs Tiempo.

QS: Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h).

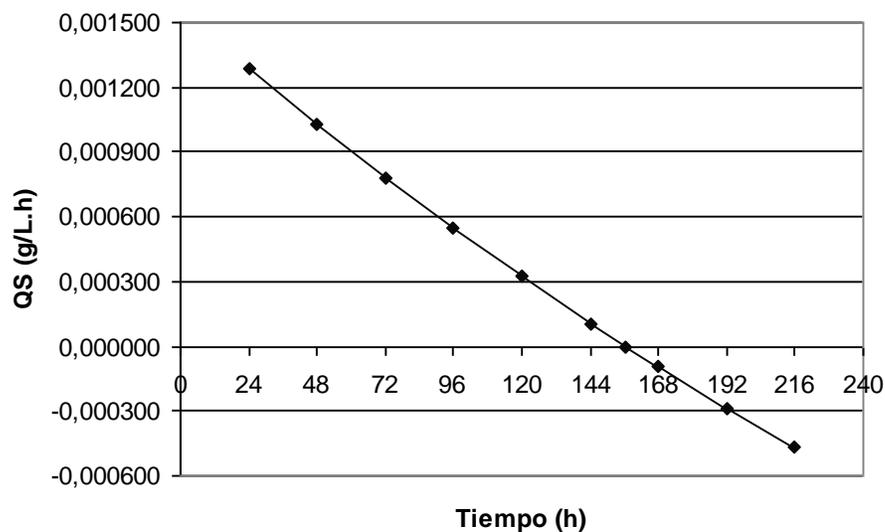


Figura N° 62: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1 idealizado.

En la figura N° 62 se observan las variaciones de la rapidez volumétrica de consumo de sustrato a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que el mayor consumo de sustrato por litro de medio de producción en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo de forma constante conforme avanza el proceso, hasta tomar valores negativos después de las 156.56 horas, estos valores negativos de QS se deben a que ha habido un aumento en la concentración de sustrato en esos puntos. QS es igual a cero cuando la concentración de azúcares deja de disminuir, es decir a partir de este punto no hay consumo aparente de sustrato.

5.3.1.5 Rapidez específica de consumo de sustrato (qs).

TABLA N° 66: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 1 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	m	X	1/X	qs = -m.1/X
24	-0,001290	0,107	9,35	1,21E-02
48	-0,001030	0,268	3,73	3,84E-03
72	-0,000783	0,678	1,47	1,15E-03
96	-0,000546	1,352	0,74	4,04E-04
120	-0,000321	1,887	0,53	1,70E-04
144	-0,000107	1,857	0,54	5,76E-05
156,56	0,000000	1,670	0,60	0,00E+00
168	0,000095	1,472	0,68	-6,46E-05
192	0,000286	1,218	0,82	-2,35E-04
216	0,000466	1,544	0,65	-3,02E-04

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada consumo de sustrato Vrs tiempo.

X: Concentración de biomasa (g/L).

qs: Rapidez especifica de consumo de sustrato (g/g.h).

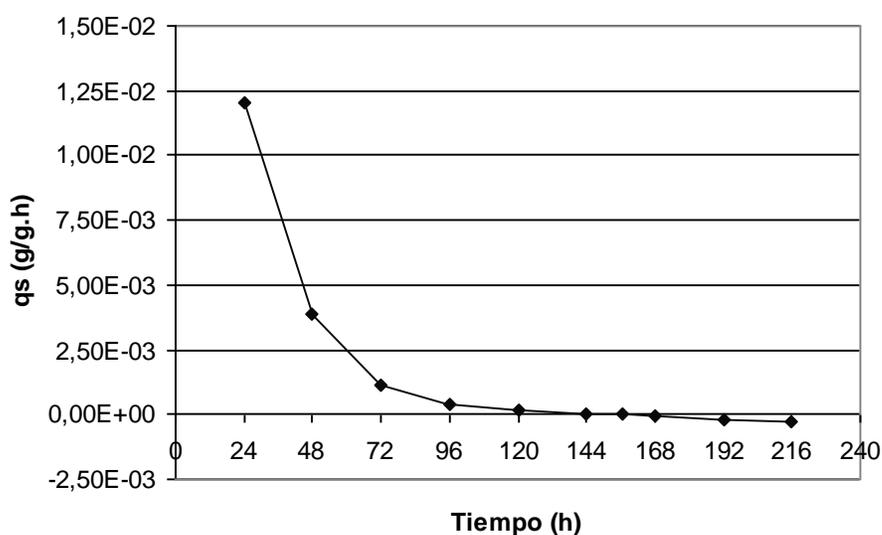


Figura N° 63: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.

En la figura N° 65 se observan las variaciones de la rapidez específica de consumo de sustrato a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que el mayor consumo de sustrato por gramo de biomasa en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso. Según puede observarse en la gráfica, la razón de cambio de q_s va disminuyendo a medida el ciclo de crecimiento se acerca a la

fase estacionaria, dicho de otra forma, q_s disminuye a medida que la tasa de crecimiento tiende a cero.

5.3.1.6 Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

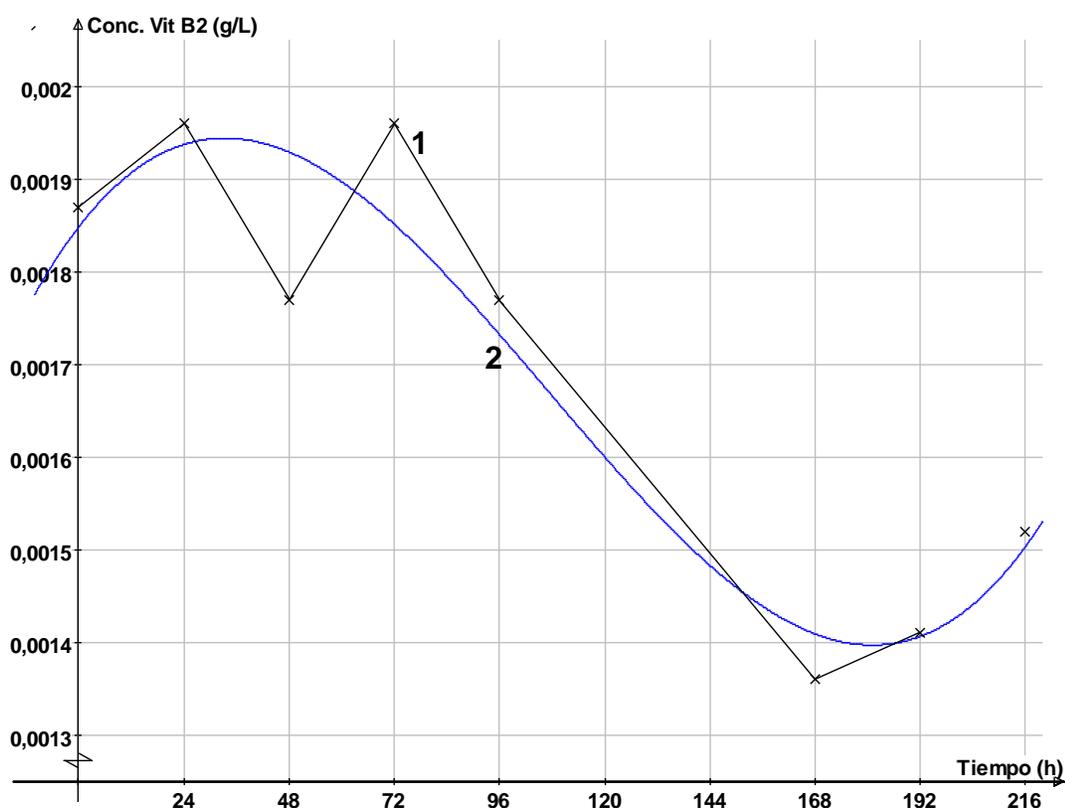


Figura N° 64: Regresión polinomial de Gráfica Concentración de Riboflavina Vrs Tiempo. Ensayo1.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 64 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indican máximos y mínimos (círculos rojos).

Dicha gráfica se representa por la ecuación:

$$y=0,00185 + 6,13E-6x - 1,09E-7x^2 + 3,4E-10x^3$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados de la tabla N° 67.

TABLA N° 67: CONCENTRACIÓN DE RIBOFLAVINA OBTENIDA POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 1. (CERO – 45 HORAS)

Tiempo (h)	Conc. Riboflavina (g/L)
0	1,8500E-03
5	1,8780E-03
10	1,9007E-03
15	1,9186E-03
20	1,9317E-03
25	1,9404E-03
30	1,9450E-03
33,31	1,9458E-03
35	1,9456E-03
40	1,9426E-03
45	1,9361E-03

TABLA N° 68: CALCULO DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 1.

Pi	Pmax	Pp = Pmax - Pi	%Pp = (Pp/Pmax).100
1,8500E-03	1,9458E-03	9,5815E-05	4,92

Donde:

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pmax: Concentración máxima de riboflavina observada (g/L).

Pp: Cantidad de riboflavina Producida (g/L).

%Pp: Porcentaje de producción de riboflavina (g/L).

La curva 2 de la figura N° 64 muestra el comportamiento que experimenta la formación de producto, en dicha gráfica se observa que la concentración de riboflavina va aumentando a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar una concentración máxima a las 33.31 horas del proceso, dicha concentración representa un aumento porcentual en riboflavina de un 4.92 por ciento. A partir de las 33.33 horas se observa un decremento en la concentración de riboflavina, lo cual se debe probablemente al uso de la flavina mononucleótido de la riboflavina como cofactor enzimático.

5.3.1.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

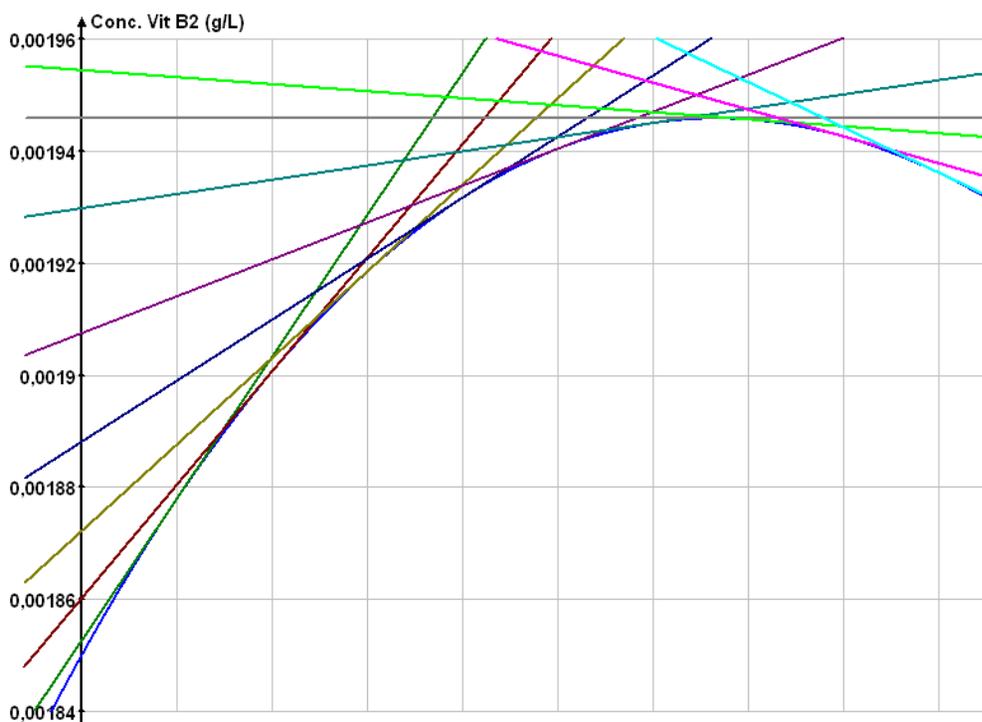


Figura N° 65: Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 1. (Cero – 45 horas)

La figura N° 65 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos (Cero – 45 horas) en la curva idealizada "concentración de Riboflavina Vrs tiempo" (Curva 2: figura N° 64), en donde las pendientes de dichas rectas representan la rapidez volumétrica de formación de producto en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 69: RESULTADOS DE RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 65.

Tiempo (h)	QP (g/L.h)
5	5,07E-06
10	4,05E-06
15	3,09E-06
20	2,18E-06
25	1,32E-06
30	5,08E-07
33,31	0,00E+00
35	-2,50E-07
40	-9,58E-07
45	-1,61E-06

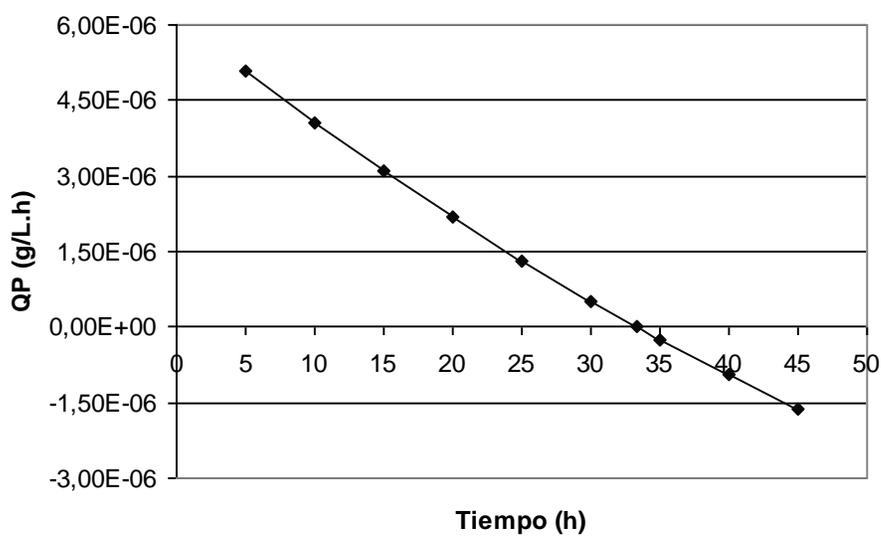


Figura N° 66: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.

En la Figura N° 66 se observan las variaciones de la rapidez volumétrica formación de producto a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que la mayor formación de producto por litro de medio de producción en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo de forma constante conforme avanza el proceso, hasta tomar valores negativos después de las 33.31 horas, estos valores negativos de QP se deben a que ha habido una disminución en la concentración de riboflavina en esos puntos. QP es igual a cero cuando la producción de riboflavina se detiene, es decir, a partir de este punto no hay producción de riboflavina.

5.3.1.8 Rapidez específica de Formación de producto (qp).

TABLA N° 70: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 1 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	m	X	1/X	qp (g/g.h)
5	5,07E-06	0,066	15,15	7,68E-05
10	4,05E-06	0,072	13,89	5,63E-05
15	3,09E-06	0,081	12,35	3,81E-05
20	2,18E-06	0,093	10,75	2,34E-05
25	1,32E-06	0,111	9,01	1,19E-05
30	5,08E-07	0,131	7,63	3,88E-06
33,31	0,00E+00	0,149	6,71	0,00E+00
35	-2,50E-07	0,159	6,29	-1,57E-06
40	-9,58E-07	0,194	5,15	-4,94E-06
45	-1,61E-06	0,237	4,22	-6,79E-06

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada formación de producto Vrs tiempo.

X: Concentración de biomasa (g/L).

qp: Rapidez especifica de formación de producto (g/g.h).

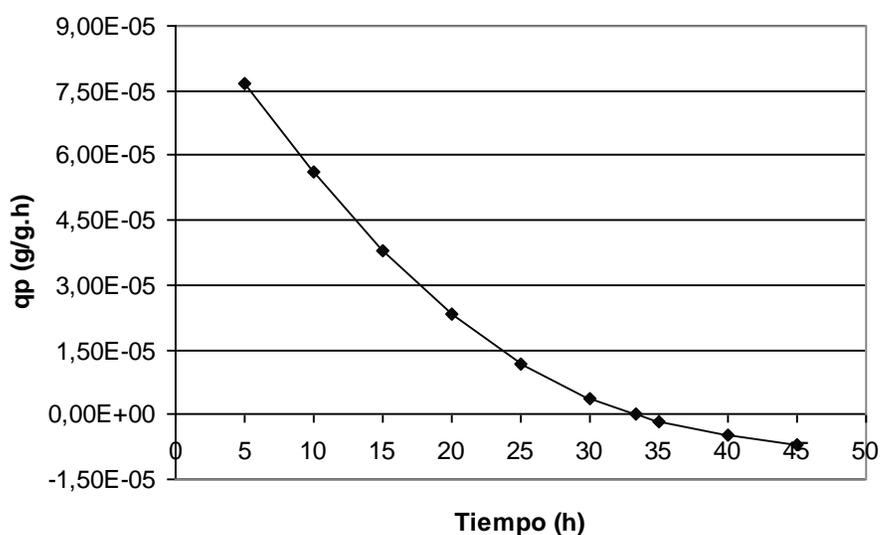


Figura N° 67: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 1 idealizado.

En la Figura N° 67 se observan las variaciones de la rapidez específica de formación de producto a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que la mayor formación de producto por gramo de biomasa en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso. Según puede observarse en la gráfica, la razón de cambio de q_p va disminuyendo a medida el ciclo de

crecimiento se acerca a la fase estacionaria, dicho de otra forma, q_p disminuye a medida que la tasa de crecimiento tiende a cero.

5.3.1.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

Como se observó anteriormente (en los cálculos a partir de datos experimentales) no es posible calcular $Y_{x/s}$ cuando no hay consumo de sustrato medible o cuando hay una disminución en la biomasa, entonces solo se consideraran para su cálculo los periodos donde se observe un consumo de sustrato acompañado de la respectiva generación de biomasa.

TABLA N° 71: CONSUMO DE SUSTRATO Y GENERACION DE BIOMASA. ENSAYO 1 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)
0	0,3330	0,062
24	0,2988	0,107
48	0,2710	0,268
72	0,2493	0,678
96	0,2333	1,352
120	0,2229	1,887
130,36	0,2201	1,946

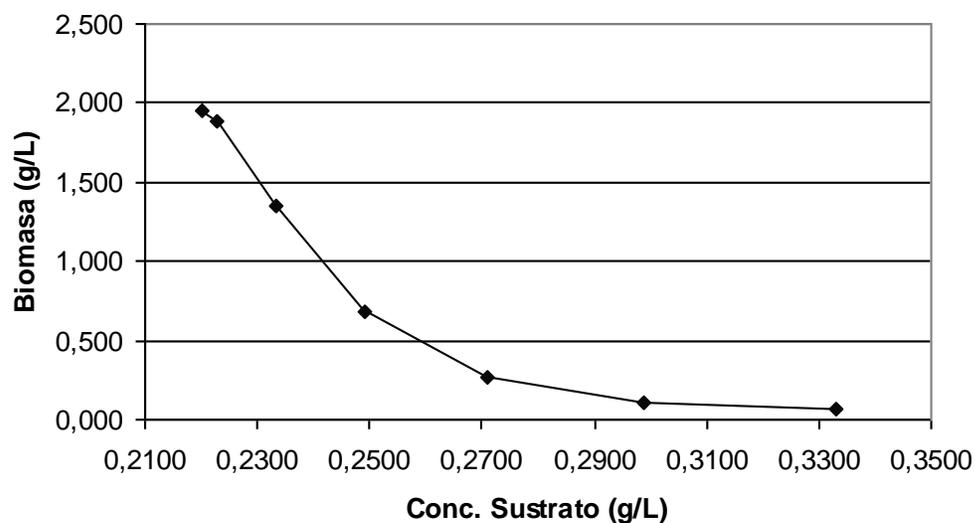


Figura Nº 68: Gráfica de biomasa Vrs concentración de sustrato. Ensayo 1 idealizado.

La figura Nº 68 Corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos de la aplicación de las respectivas ecuaciones de regresión polinomial a los datos experimentales de biomasa y concentración de sustrato (tabla Nº 71). En dicha gráfica se muestra la relación que existe entre la cantidad de biomasa que se genera y la cantidad de sustrato que se consume. Como puede observarse la cantidad de biomasa aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA N° 72: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 1(TABLA N° 71).

Tiempo (h)	Si	Sf	Xi	Xf	$Y_{x/s} = -(X_f - X_i)/(S_f - S_i)$
0	-	0,3330	-	0,062	-
24	0,3330	0,2988	0,062	0,107	1,32
48	0,2988	0,2710	0,107	0,268	5,79
72	0,2710	0,2493	0,268	0,678	18,89
96	0,2493	0,2333	0,678	1,352	42,13
120	0,2333	0,2229	1,352	1,887	51,44
130,36	0,2229	0,2201	1,887	1,946	21,07

Donde:

Xi: Concentración inicial de biomasa (g/L).

Xf: Concentración final de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

Y_{x/s}: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

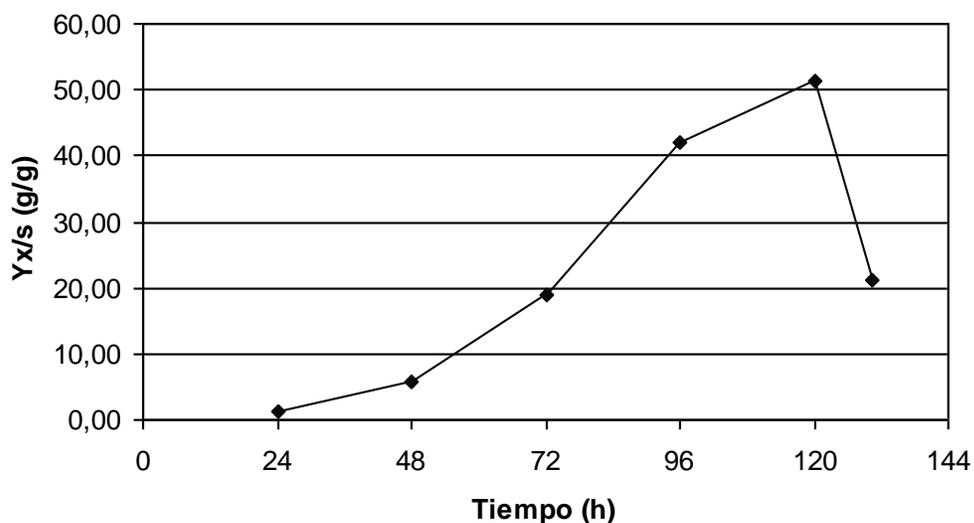


Figura N° 69: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1 idealizado.

La Figura N° 69 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa como $Y_{x/s}$ aumenta a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar su mayor valor a las 120 horas del proceso. El sustrato consumido después de las 130.36 horas, probablemente es utilizado para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula y cualquier generación de biomasa observada después de este punto probablemente se deba aun aumento en las concentraciones de sustrato (consumo de sustrato no medible) o bien se trata de un crecimiento críptico.

5.3.1.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$).

Como se observo anteriormente (en los cálculos a partir de datos experimentales) no es posible calcular $Y_{p/s}$ cuando no hay consumo de sustrato medible o cuando hay una disminución en la concentración de producto, entonces solo se consideraran para su calculo los periodos donde se observe un consumo de sustrato acompañado de la respectiva formación de producto.

TABLA Nº 73: CONSUMO DE SUSTRATO Y FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 1 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Conc. Riboflavina (g/L)
0	0,3330	0,001850
5	0,3253	0,001878
10	0,3180	0,001901
15	0,3109	0,001919
20	0,3041	0,001932
25	0,2975	0,001940
30	0,2913	0,001945
33,31	0,2873	0,001946

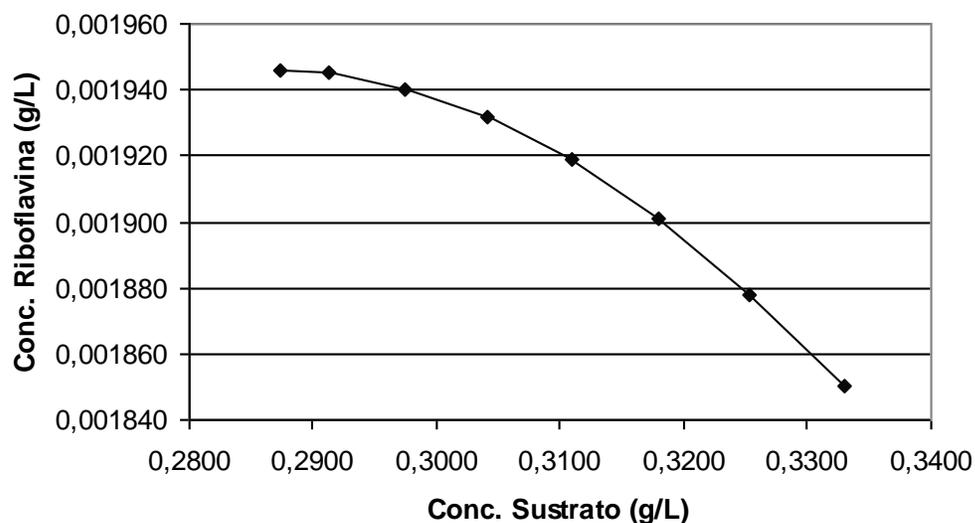


Figura N° 70: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs concentración de sustrato. Ensayo 1 idealizado.

La figura N° 70 Corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos de la aplicación de las respectivas ecuaciones de regresión polinomial a los datos experimentales de concentración de Riboflavina y concentración de sustrato (tabla N° 73). En dicha gráfica se muestra la relación que existe entre la cantidad de riboflavina que se produce y la cantidad de sustrato que se consume. Como puede observarse la concentración de Riboflavina aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA N° 74: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 1(TABLA N° 73).

Tiempo (h)	Si	Sf	Pi	Pf	$Y_{p/s} = -(Pf - Pi)/(Sf - Si)$
0	-	0,3330	-	0,001850	-
5	0,3330	0,3253	0,001850	0,001878	0,0036
10	0,3253	0,3180	0,001878	0,001901	0,0032
15	0,3180	0,3109	0,001901	0,001919	0,0025
20	0,3109	0,3041	0,001919	0,001932	0,0019
25	0,3041	0,2975	0,001932	0,001940	0,0012
30	0,2975	0,2913	0,001940	0,001945	0,0008
33,31	0,2913	0,2873	0,001945	0,001946	0,0003

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

YP/s: Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (g/g).

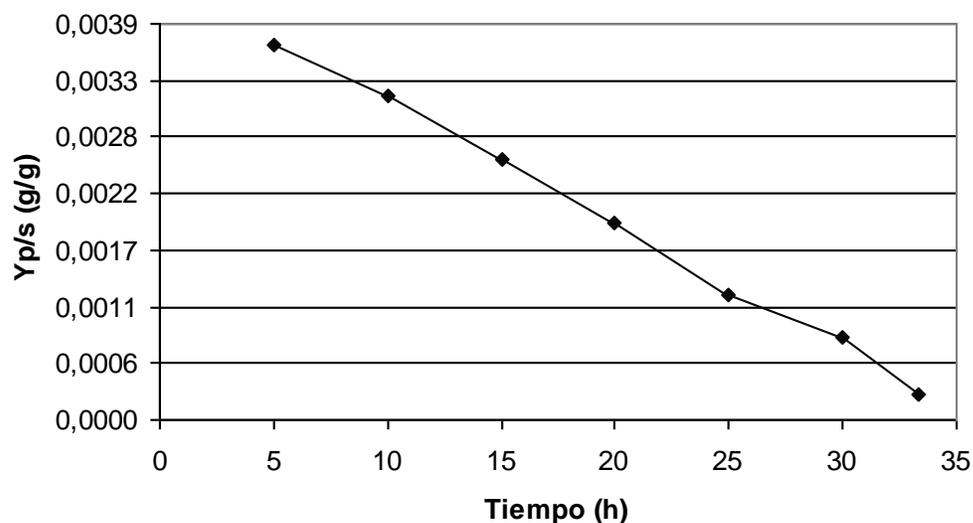


Figura N° 71: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 1 idealizado.

La Figura N° 71 representa la eficacia de conversión del sustrato en riboflavina. Dicho de otra forma, representa la cantidad de riboflavina formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que la mayor conversión de sustrato en riboflavina se da en los inicios de la fase de crecimiento, Yp/s va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar su valor mínimo a las 33.31 horas del proceso. El consumo de sustrato medible después de este punto es utilizado exclusivamente para la generación de biomasa y/o para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula,

5.3.2 Idealización de Ensayo 2 (Sacarosa como aditivo).

5.3.2.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

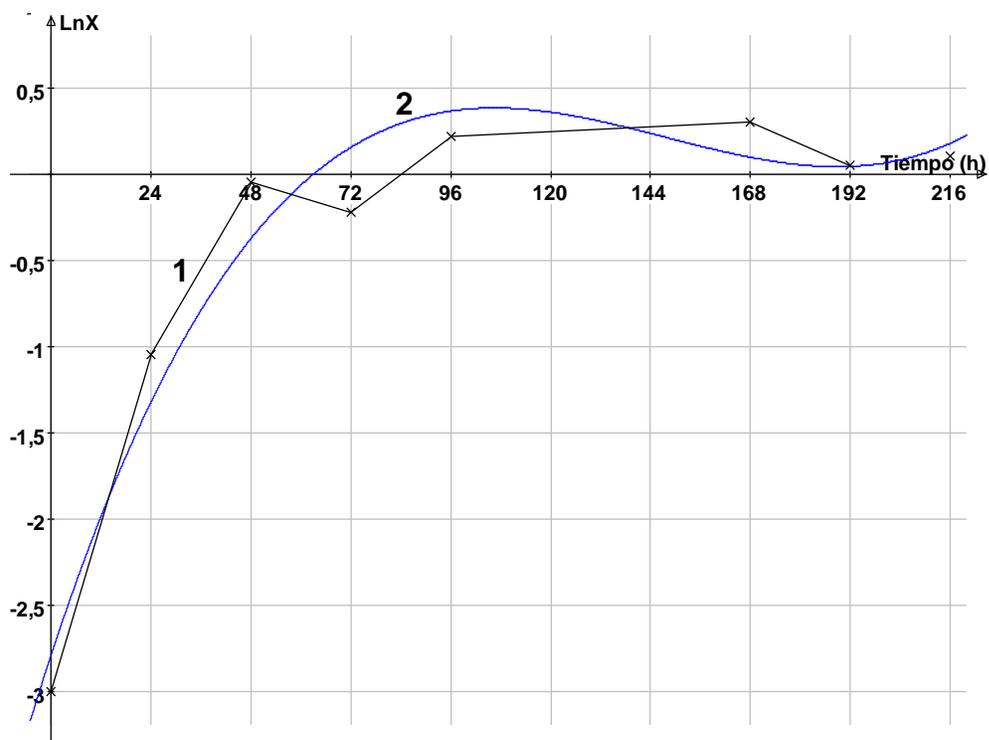


Figura N° 72: Regresión polinomial de Gráfica LnX Vrs Tiempo. Ensayo 2.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 72 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indican sus máximos y mínimos (círculos rojos).

Dicha gráfica es representada por la ecuación:

$$y = -2,79 + 0,0735x - 0,00054x^2 + 1,22E-6x^3$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla 75.

TABLA N° 75: RESULTADOS DE BIOMASA OBTENIDOS POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	LnX	Biomasa (g/L)
0	-2,790	0,061
24	-1,320	0,267
48	-0,371	0,690
72	0,158	1,171
96	0,369	1,446
106,47	0,387	1,472
120	0,362	1,436
144	0,239	1,271
168	0,102	1,107
188,60	0,049	1,050
192	0,050	1,052
216	0,187	1,205

TABLA N° 76: CALCULO DE GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 2.

X_i	X_{max}	$X_p = X_{max} - X_i$	$X\% = (X_p/X_{max}).100$
0.061	1.472	1.411	95.83

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_{max} : Concentración máxima de biomasa (g/L).

X_p : Cantidad de biomasa generada (g/L).

$\%X_p$: Generación porcentual de biomasa (%).

La curva 2 de la figura N° 72 muestra el comportamiento que experimenta la generación de biomasa a lo largo del proceso fermentativo. En dicha gráfica, se observa que la biomasa va en aumento desde las cero horas y alcanza una concentración máxima a las 106.47 horas, dicha concentración representa un aumento porcentual en biomasa de un 95.83 por ciento. La biomasa disminuye en el periodo comprendido entre las 106.47 y las 188.60 horas, aumentando nuevamente después de este periodo. Dado lo anterior y si consideramos que la biomasa es aproximadamente constante entre las 96 y 120 horas, podemos identificar en la gráfica cuatro fases características del crecimiento microbiano en un cultivo por lotes, entonces tenemos que la fase de crecimiento se da en el periodo comprendido de cero a 96 del proceso, la fase estacionaria se observa entre las 96 y 120 horas, la fase de muerte se da entre las 120 y 188.60 horas,

y finalmente se observa una fase de crecimiento crítico a partir de las 188.60 horas.

5.3.2.2 Rapidez específica de crecimiento (μ).

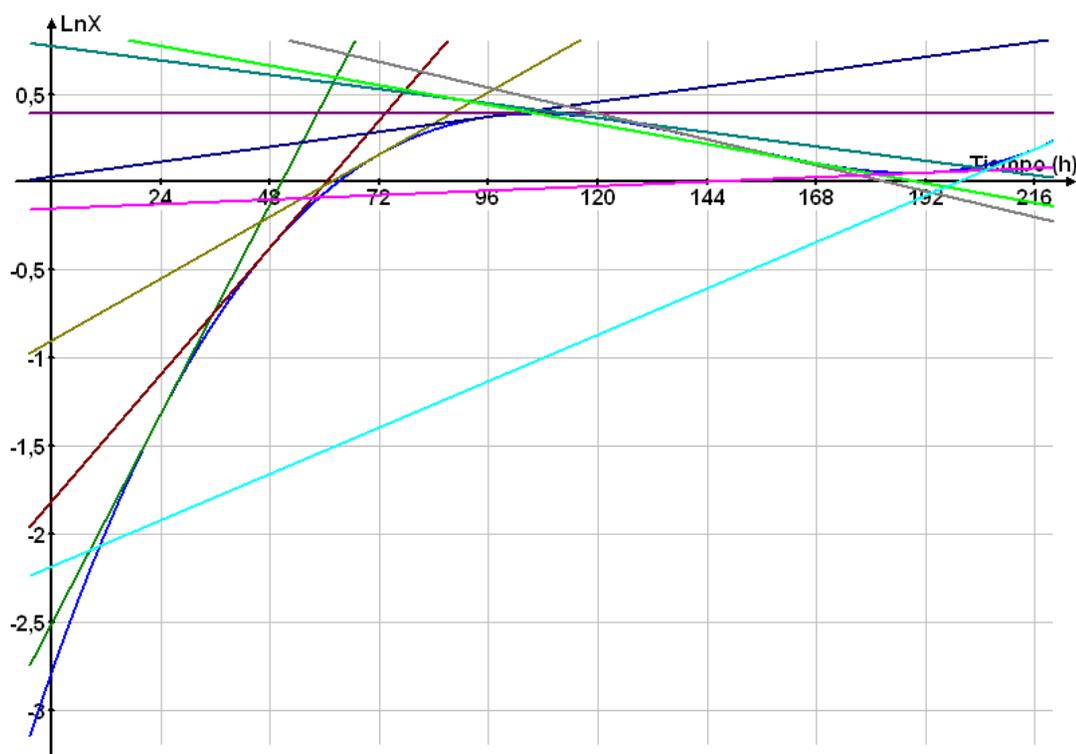


Figura N° 73: Rectas tangentes a la curva idealizada $\ln x$ Vrs tiempo. Ensayo 2.

La figura N° 73 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada $\ln x$ Vrs tiempo (Curva 2: figura N° 72), en donde las pendientes de dichas rectas representan la rapidez específica de crecimiento en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 77: RESULTADOS DE RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 73.

Tiempo (h)	μ (1/h)
24	0,0497
48	0,0301
72	0,0147
96	0,0036
106,47	0,0000
120	-0,0034
144	-0,0061
168	-0,0046
188,60	0,0000
192	0,0011
216	0,0110

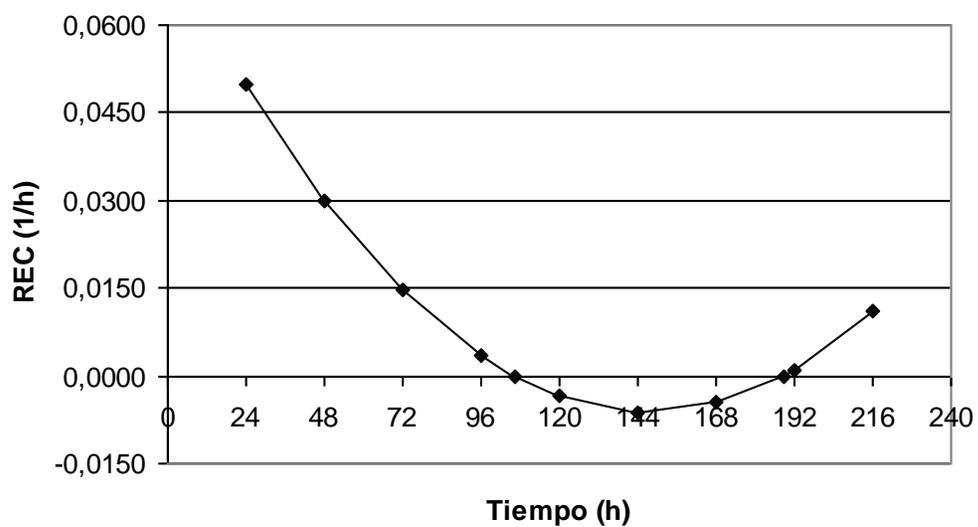


Figura N° 74: Gráfico de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.

En la Figura N° 74 se observan las variaciones de la rapidez específica de crecimiento a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que la mayor tasa de crecimiento por unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento. Los valores negativos de μ indican que la velocidad de lisis celular supera a la velocidad de generación de células y por tanto estos puntos se encuentran dentro de la fase de muerte. μ es igual a cero en los puntos donde la curva 2 de la figura N° 72 presenta sus máximos y mínimos, en estos puntos la velocidad de lisis celular es igual a la velocidad de generación de células, lo que indica que la biomasa se mantiene aproximadamente constante en los puntos cercanos a las rectas tangentes a los máximos y mínimos.

5.3.2.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

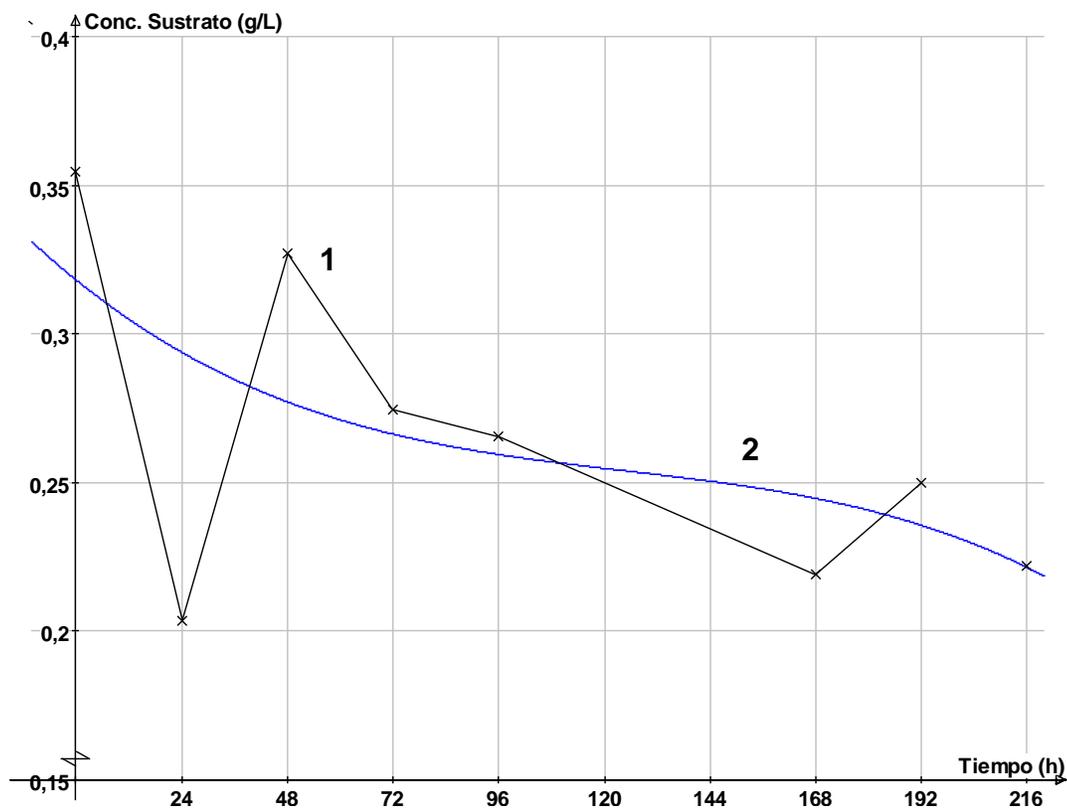


Figura Nº 75: Regresión polinomial de Gráfica Concentración de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 75 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente. Dicha curva es representada por la ecuación:

$$y = 0,318 - 0,0012x + 8,22E-6x^2 - 2,2E-8x^3$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla N° 78.

TABLA N° 78: RESULTADOS DE AZÚCARES TOTALES OBTENIDOS POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)
0	0,3180
24	0,2936
48	0,2769
72	0,2660
96	0,2591
120	0,2544
144	0,2500
168	0,2441
192	0,2349
216	0,2206

TABLA N° 79: CALCULO DEL CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 2.

Si	Smin	Sc = Si - Smin	%Sc = (Sc/Si).100
0.3180	0.2206	0.0974	30.63

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Smin: Concentración mínima de sustrato observada (g/L).

Sc: Cantidad de sustrato consumido (g/L).

%Sc: Consumo porcentual de sustrato (%).

La curva 2 de la figura N° 75 muestra el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato a lo largo del proceso, en dicha gráfica se observa que la concentración de sustrato va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, dándose un consumo total del 30.63 por ciento del sustrato inicial.

5.3.2.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

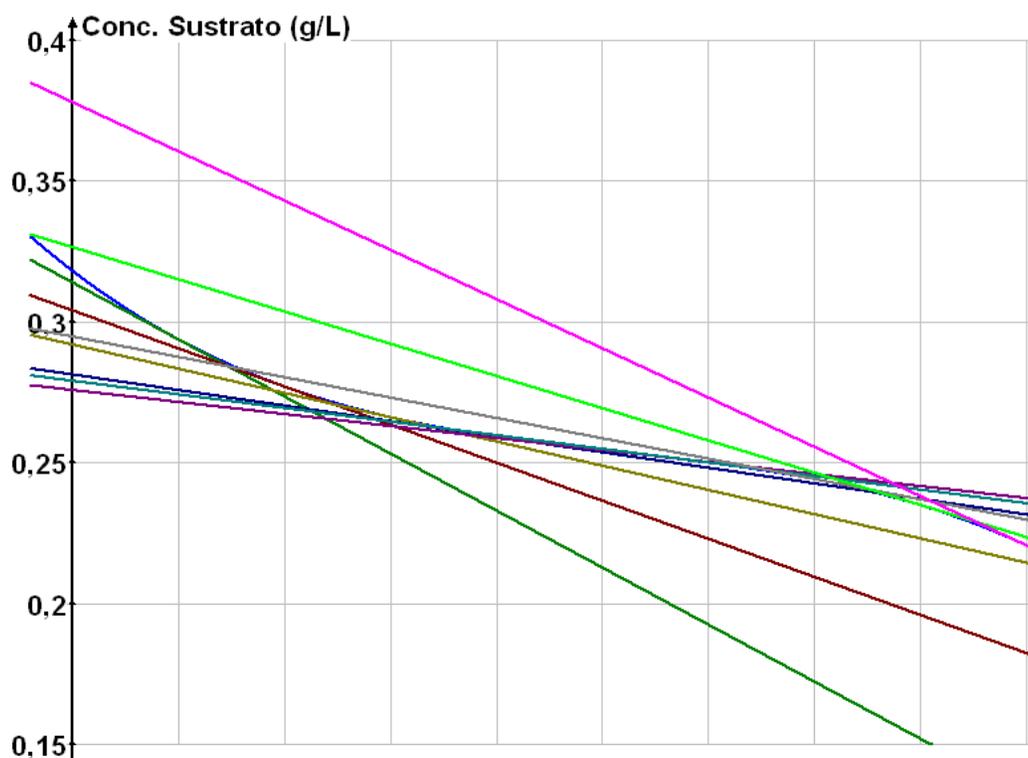


Figura N° 76: Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2.

La figura N° 76 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada "concentración de sustrato Vrs tiempo" (Curva 2: figura N° 75), en donde el negativo de las pendientes de dichas rectas representan la rapidez volumétrica de consumo de sustrato en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 80: RESULTADOS DE RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 76.

Tiempo (h)	m	QS = -m
24	-0,000843	0,000843
48	-0,000563	0,000563
72	-0,000358	0,000358
96	-0,000230	0,000230
120	-0,000178	0,000178
144	-0,000201	0,000201
168	-0,000301	0,000301
192	-0,000477	0,000477
216	-0,000728	0,000728

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada consumo de sustrato Vrs Tiempo.

QS: Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h).

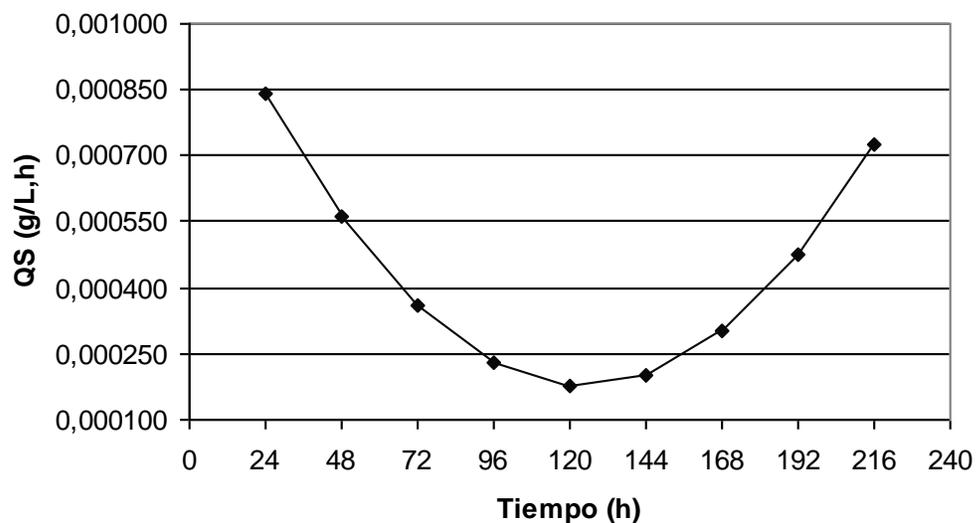


Figura N° 77: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2 idealizado.

En la figura N° 77 se observan las variaciones de la rapidez volumétrica de consumo de sustrato a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que el mayor consumo de sustrato por litro de medio de producción en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso hasta alcanzar su valor mínimo a las 120 horas. QS va en aumento a partir de las 120 horas.

5.3.2.5 Rapidez específica de consumo de sustrato (qs).

TABLA N° 81: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 2 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	m	X	1/X	qs = -m.1/X
24	-0,000843	0,267	3,75	3,16E-03
48	-0,000563	0,690	1,45	8,16E-04
72	-0,000358	1,171	0,85	3,06E-04
96	-0,000230	1,446	0,69	1,59E-04
120	-0,000178	1,436	0,70	1,24E-04
144	-0,000201	1,271	0,79	1,58E-04
168	-0,000301	1,107	0,90	2,72E-04
192	-0,000477	1,052	0,95	4,53E-04
216	-0,000728	1,205	0,83	6,04E-04

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada consumo de sustrato Vrs tiempo.

X: Concentración de biomasa (g/L).

qs: Rapidez específica de consumo de sustrato (g/g.h).

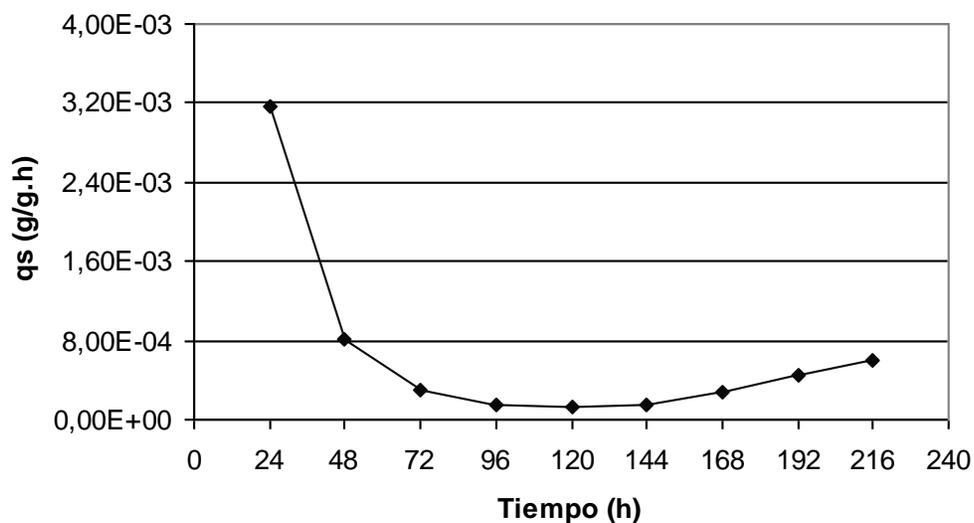


Figura N° 78: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.

En la figura N° 78 se observan las variaciones de la rapidez específica de consumo de sustrato a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que el mayor consumo de sustrato por gramo de biomasa en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso hasta alcanzar su valor mínimo a las 120 horas. q_s va en aumento a partir de las 120 horas.

Como puede observarse en la gráfica, q_s disminuye a medida el ciclo de crecimiento se acerca a la fase estacionaria, dicho de otra forma, q_s disminuye a medida que la tasa de crecimiento tiende a cero, también se observa que q_s aumenta a medida se abandona la fase de muerte.

5.3.2.6 Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

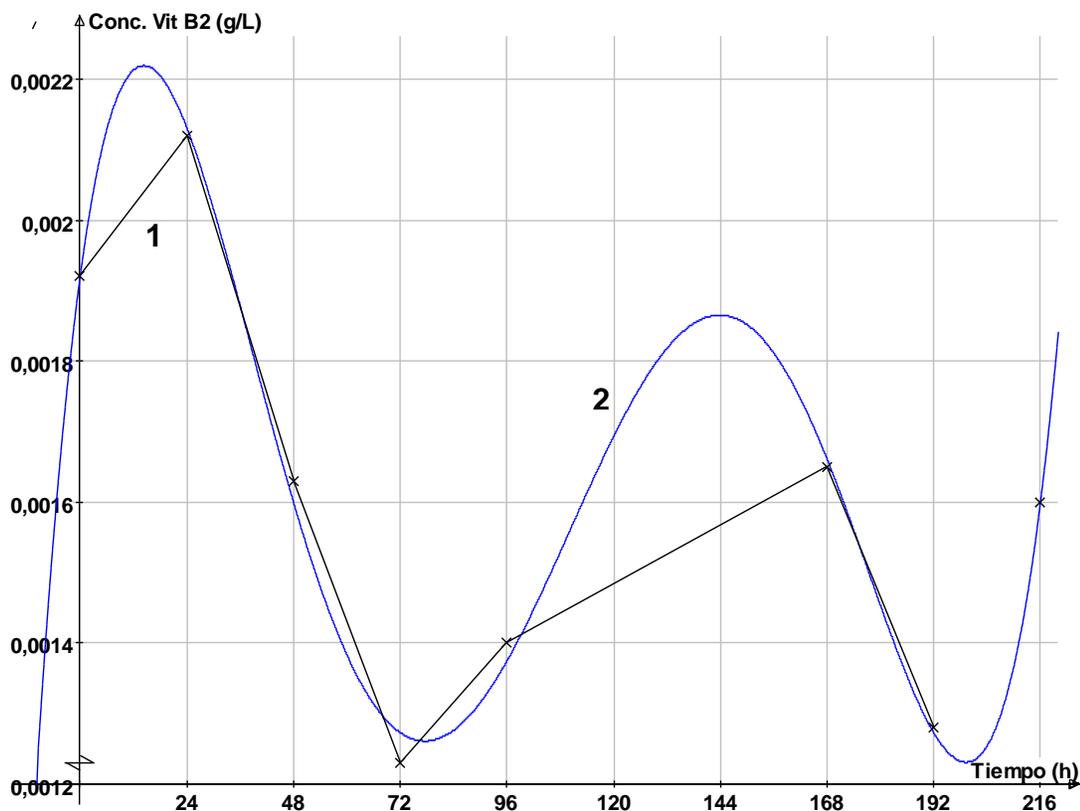


Figura N° 79: Regresión polinomial de Gráfica Concentración de Riboflavina Vrs Tiempo. Ensayo 2.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1. (idealización).

La curva 2 de la figura N° 79 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indican máximos y mínimos (círculos rojos).

Dicha gráfica se representa por la ecuación:

$$y = 0,00192 + 4,74E-5x - 2,25E-6x^2 + 3,06E-8x^3 - 1,63E-10x^4 + 3E-13x^5$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla N° 82.

TABLA N° 82: CONCENTRACIÓN DE RIBOFLAVINA OBTENIDA POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 2. (CERO – 30 HORAS)

Tiempo (h)	Conc. Vitamina B ₂ (g/L)
0	1,9200E-03
2,5	2,0249E-03
5	2,1045E-03
7,5	2,1613E-03
10	2,1980E-03
12,5	2,2168E-03
14,29	2,2206E-03
15	2,2200E-03
17,5	2,2096E-03
20	2,1877E-03
22,5	2,1559E-03
25	2,1161E-03
27,5	2,0698E-03
30	2,0185E-03

TABLA N° 83: CALCULO DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS ENSAYO 2.

Pi	Pmax	Pp = Xmax - Xi	%Pp = (Xp/Xmax).100
1.9200E-03	2.2206E-03	3.0056E-04	13.54

Donde:

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pmax: Concentración máxima de riboflavina observada (g/L).

Pp: Cantidad de riboflavina Producida (g/L).

%Pp: Porcentaje de producción de riboflavina (%).

La curva 2 de la figura N° 79 muestra el comportamiento que experimenta la formación de producto, en dicha gráfica se observa que la concentración de riboflavina va aumentando a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar una concentración máxima a las 14.29 horas del proceso, dicha concentración representa un aumento porcentual en riboflavina de un 13.54 por ciento. A partir de las 14.29 horas se observa un decremento en la concentración de riboflavina, lo cual se debe probablemente al uso de la flavina mononucleótido de la riboflavina como cofactor enzimático.

5.3.2.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

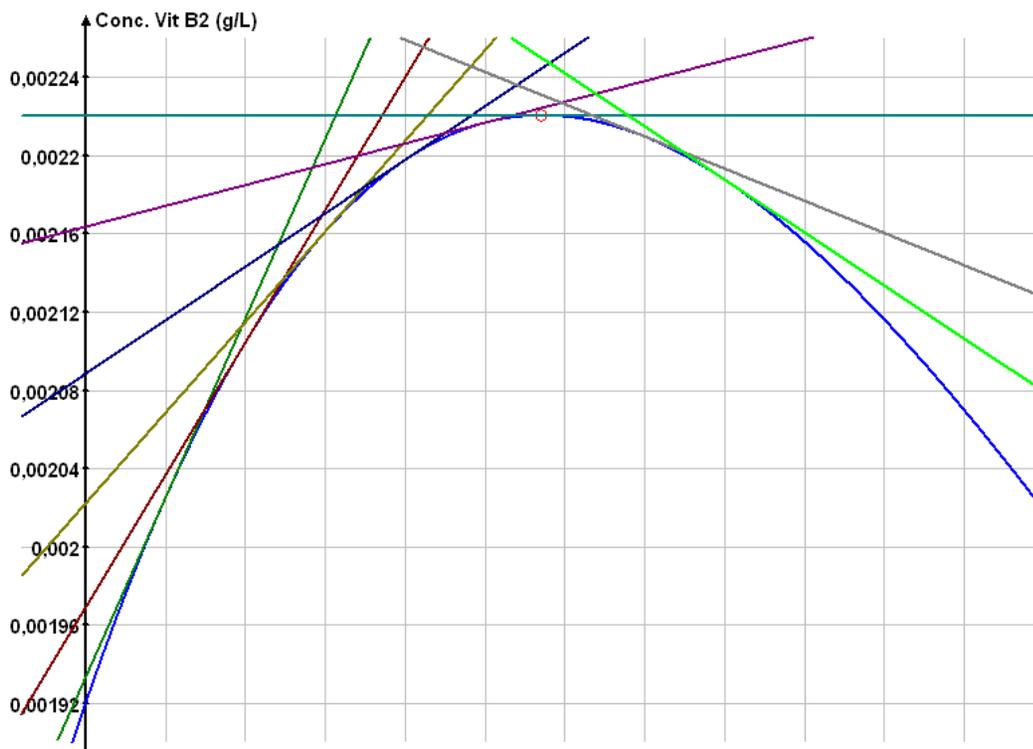


Figura N° 80: Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 2. (Cero – 30 horas).

La Figura N° 80 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos (Cero – 30 horas) en la curva idealizada "concentración de Riboflavina Vrs tiempo" (Curva 2: figura N° 79), en donde las pendientes de dichas rectas representan la rapidez volumétrica de formación de producto en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 84: RESULTADOS DE RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 80.

Tiempo (h)	QP (g/L.h)
2,5	3,67E-05
5	2,71E-05
7,5	1,85E-05
10	1,09E-05
12,5	4,26E-06
14,29	0,00E+00
15	-1,57E-06
17,5	-6,59E-06
20	-1,09E-05

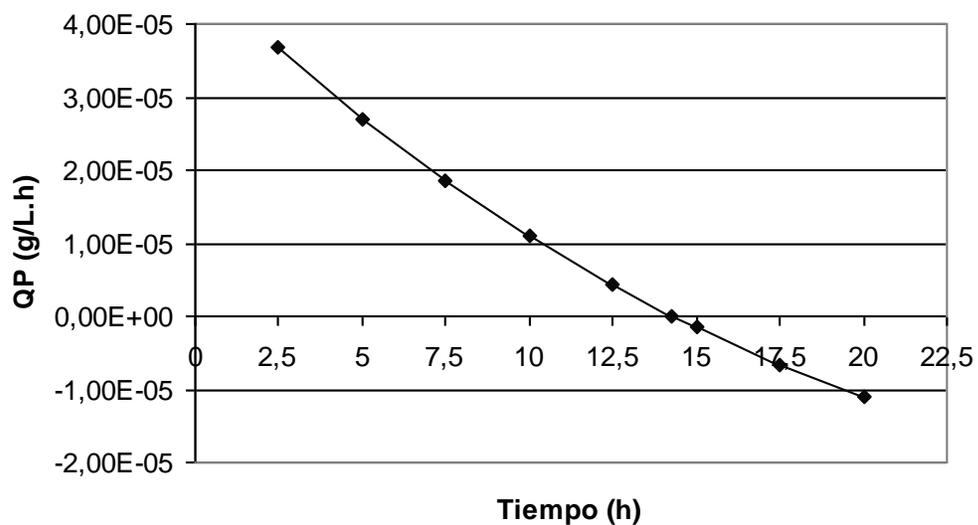


Figura N° 81: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.

En la Figura N° 81 se observan las variaciones de la rapidez volumétrica de formación de producto a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que la mayor formación de producto por litro de medio de producción en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo de forma aproximadamente constante conforme avanza el proceso, hasta tomar valores negativos después de las 14.29 horas, estos valores negativos de QP se deben a que ha habido una disminución en la concentración de riboflavina en esos puntos. QP es igual a cero cuando la producción de riboflavina se detiene, es decir, a partir de este punto no hay producción de riboflavina.

5.3.2.8 Rapidez específica de Formación de producto (qp).

TABLA N° 85: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 2 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	m	X	1/X	qp = m.1/X
2,5	3,67E-05	0,074	13,51	4,96E-04
5	2,71E-05	0,087	11,49	3,11E-04
7,5	1,85E-05	0,103	9,71	1,80E-04
10	1,09E-05	0,121	8,26	9,01E-05
12,5	4,26E-06	0,142	7,04	3,00E-05
14,29	0,00E+00	0,158	6,33	0,00E+00
15	-1,57E-06	0,165	6,06	-9,52E-06
17,5	-6,59E-06	0,190	5,26	-3,47E-05
20	-1,09E-05	0,217	4,61	-5,02E-05

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada formación de producto Vrs tiempo.

X: Concentración de biomasa (g/L).

qp: Rapidez especifica de formación de producto (g/g.h).

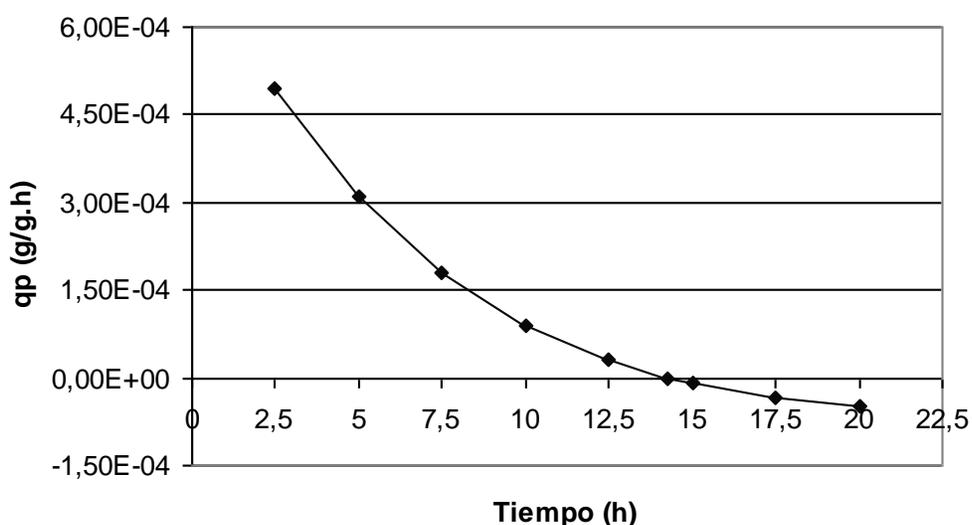


Figura N° 82: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 2 idealizado.

En la Figura N° 82 se observan las variaciones de la rapidez específica de formación de producto a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que la mayor formación de producto por gramo de biomasa en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso. Según puede observarse en la gráfica, la razón de cambio de qp va disminuyendo a medida el ciclo de

crecimiento se acerca a la fase estacionaria, dicho de otra forma, q_p disminuye a medida que la tasa de crecimiento tiende a cero.

5.3.2.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

Como se observó anteriormente (en los cálculos a partir de datos experimentales) no es posible calcular $Y_{x/s}$ cuando no hay consumo de sustrato medible o cuando hay una disminución en la biomasa, entonces solo se consideraran para su cálculo los periodos donde se observe un consumo de sustrato acompañado de la respectiva generación de biomasa.

TABLA N° 86: CONSUMO DE SUSTRATO Y GENERACION DE BIOMASA. ENSAYO 2 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)
0	0,3180	0,061
24	0,2936	0,267
48	0,2769	0,690
72	0,2660	1,171
96	0,2591	1,446
106,47	0,2569	1,472

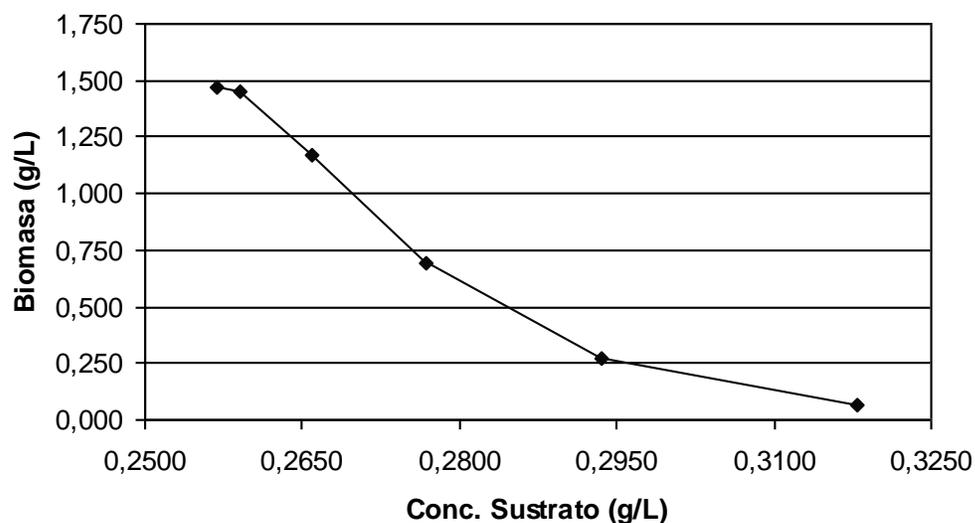


Figura Nº 83: Gráfica de biomasa Vrs concentración de sustrato. Ensayo 2 idealizado.

La figura Nº 83 Corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos de la aplicación de las respectivas ecuaciones de regresión polinomial a los datos experimentales de biomasa y concentración de sustrato (tabla Nº 86). En dicha gráfica se muestra la relación que existe entre la cantidad de biomasa que se genera y la cantidad de sustrato que se consume. Como puede observarse la cantidad de biomasa aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA Nº 87: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 2 (TABLA Nº 86).

Tiempo (h)	Si	Sf	Xi	Xf	$Y_{x/s} = -(X_f - X_i)/(S_f - S_i)$
0	-	0,3180	-	0,061	-
24	0,3180	0,2936	0,061	0,267	8,44
48	0,2936	0,2769	0,267	0,690	25,33
72	0,2769	0,2660	0,690	1,171	44,13
96	0,2660	0,2591	1,171	1,446	39,86
106,47	0,2591	0,2569	1,446	1,472	11,82

Donde:

Xi: Concentración inicial de biomasa (g/L).

Xf: Concentración final de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

$Y_{x/s}$: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

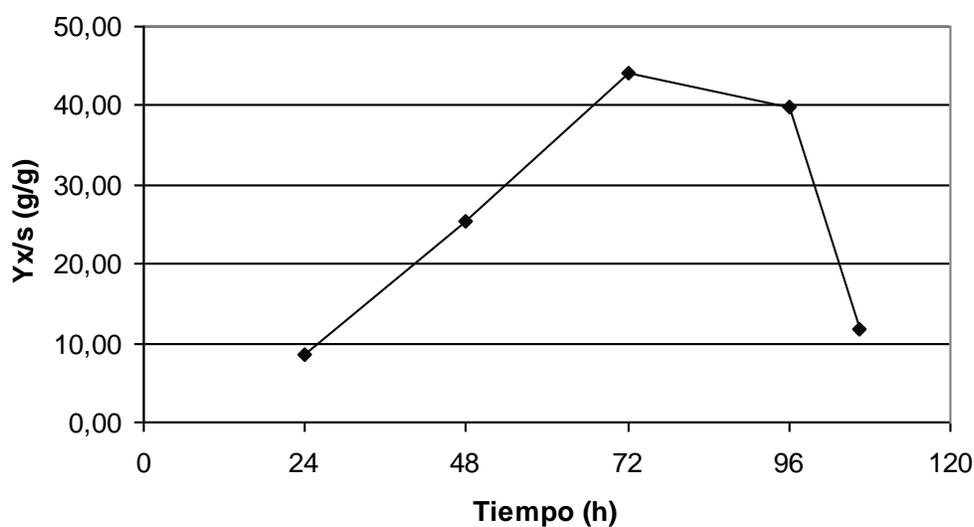


Figura Nº 84: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2 idealizado.

La figura N° 84 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa como $Y_{x/s}$ aumenta a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar su mayor valor a las 72 horas del proceso. El sustrato consumido después de las 106.47 horas, probablemente es utilizado para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula.

TABLA N° 88: CONSUMO DE SUSTRATO Y GENERACION DE BIOMASA (CRECIMIENTO CRÍPTICO). ENSAYO 2 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)
188,60	0,2365	1,050
195	0,2334	1,057
200	0,2308	1,073
205	0,2279	1,099
210	0,2248	1,138
216	0,2206	1,205

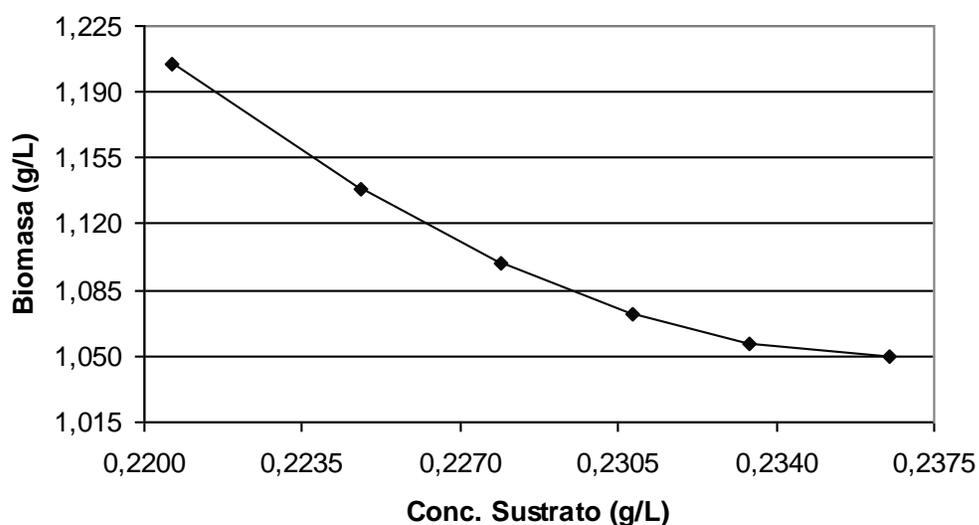


Figura N° 85: Gráfica de biomasa Vrs concentración de sustrato (fase de crecimiento críptico) Ensayo 2 idealizado.

En la Figura N° 85 se muestra la relación que existe entre la cantidad de biomasa que se genera y la cantidad de sustrato que se consume durante la fase de crecimiento críptico. Como puede observarse la cantidad de biomasa aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA N° 89: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO OBTENIDO A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 2 (TABLA N° 88).

Tiempo (h)	Si	Sf	Xi	Xf	$Y_{x/s} = -(X_f - X_i)/(S_f - S_i)$
188,60	-	0,2365	-	1,050	-
195	0,2365	0,2334	1,050	1,057	2,19
200	0,2334	0,2308	1,057	1,073	6,08
205	0,2308	0,2279	1,073	1,099	9,17
210	0,2279	0,2248	1,099	1,138	12,61
216	0,2248	0,2206	1,138	1,205	15,93

Donde:

Xi: Concentración inicial de biomasa (g/L).

Xf: Concentración final de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

Yx/s: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

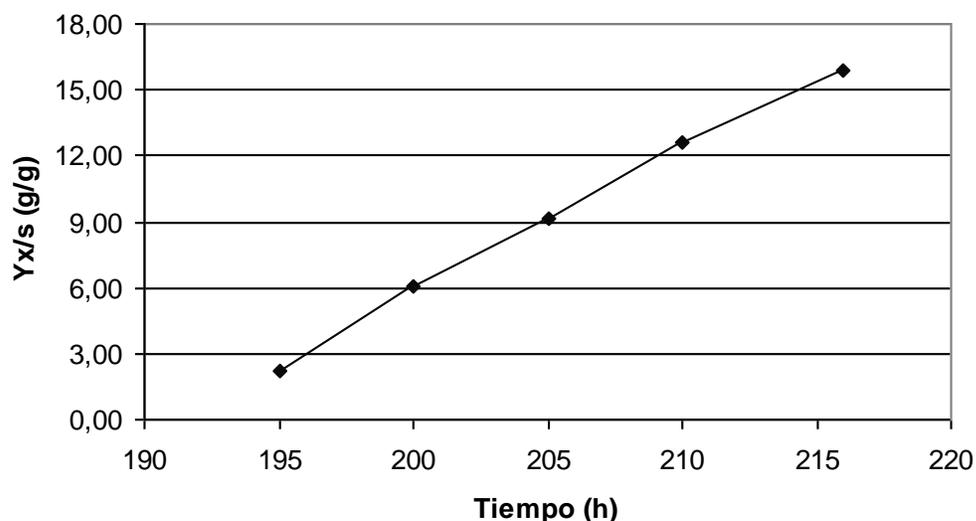


Figura N° 86: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo (Fase de crecimiento crítico) Ensayo 2 idealizado.

La figura N° 86 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa como $Y_{x/s}$ aumenta a medida transcurre el tiempo, estos valores no exceden a los observados durante la fase de crecimiento.

5.3.2.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$).

Como se observó anteriormente (en los cálculos a partir de datos experimentales) no es posible calcular $Y_{p/s}$ cuando no hay consumo de sustrato medible o cuando hay una disminución en la concentración de producto, entonces solo se consideraran para su calculo los periodos donde se

observe un consumo de sustrato acompañado de la respectiva formación de producto.

TABLA Nº 90: CONSUMO DE SUSTRATO Y FORMACIÓN DE PRODUCTO.
ENSAYO 2 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Conc. Producto (g/L)
0	0,3180	0,001920
2,5	0,3151	0,002025
5	0,3122	0,002104
7,5	0,3095	0,002161
10	0,3068	0,002198
12,5	0,3042	0,002217
14,29	0,3025	0,002221

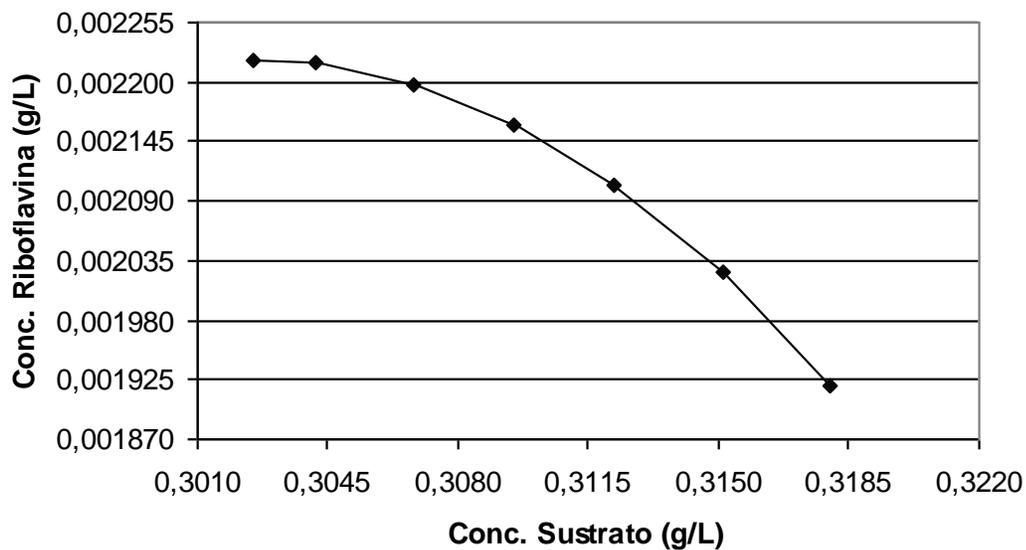


Figura Nº 87: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs concentración de sustrato. Ensayo 2 idealizado.

La figura N° 87 Corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos de la aplicación de las respectivas ecuaciones de regresión polinomial a los datos experimentales de concentración de Riboflavina y concentración de sustrato (tabla N° 90). En dicha gráfica se muestra la relación que existe entre la cantidad de Riboflavina que se produce y la cantidad de sustrato que se consume. Como puede observarse, la concentración de Riboflavina aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA N° 91: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 2(TABLA N° 90).

Tiempo (h)	Si	Sf	Pi	Pf	$Yp/s = -(Pf - Pi)/(Sf - Si)$
0	-	0,3180	-	0,001920	-
2,5	0,3180	0,3151	0,001920	0,002025	0,0362
5	0,3151	0,3122	0,002025	0,002104	0,0272
7,5	0,3122	0,3095	0,002104	0,002161	0,0211
10	0,3095	0,3068	0,002161	0,002198	0,0137
12,5	0,3068	0,3042	0,002198	0,002217	0,0073
14,29	0,3042	0,3025	0,002217	0,002221	0,0024

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

YP/s: Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (g/g).

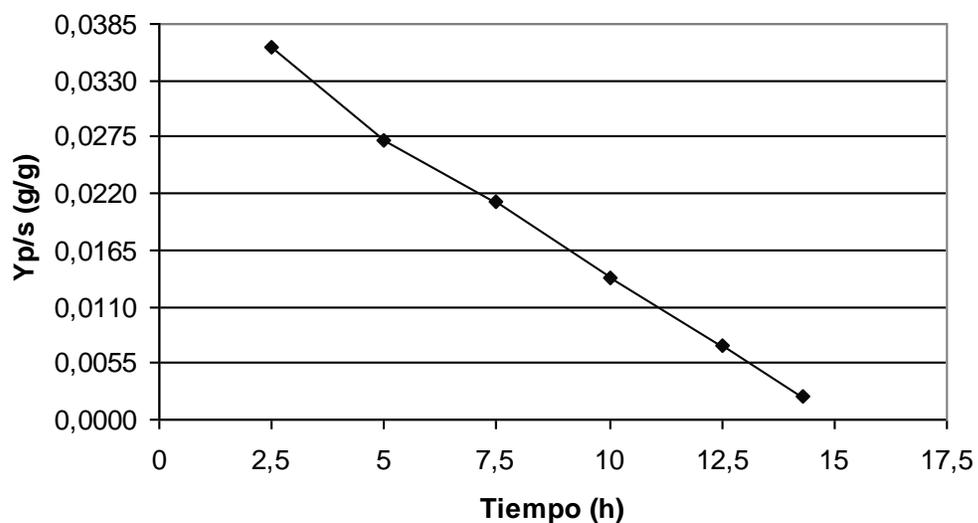


Figura N° 88: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 2 idealizado.

La figura N° 88 representa la eficacia de conversión del sustrato en riboflavina. Dicho de otra forma, representa la cantidad de riboflavina formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que la mayor conversión de sustrato en riboflavina se da en los inicios de la fase de crecimiento, $Y_{p/s}$ va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar su valor mínimo a las 14.29 horas del proceso.

5.3.3 Idealización de ensayo 3 (Sacarosa y sales inorgánicas como aditivos).

5.3.3.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco.

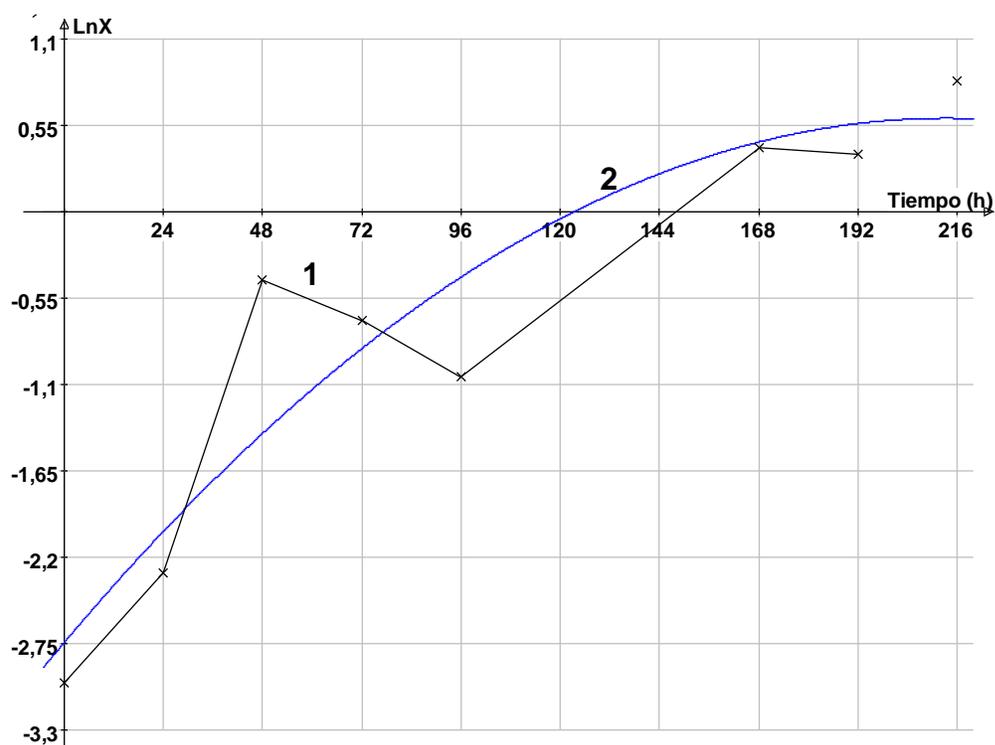


Figura N° 89: Regresión polinomial de Gráfica LnX Vrs Tiempo. Ensayo 3.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 89 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indica su máximo (circulo rojo). Dicha gráfica es representada por la ecuación: $y = -2,74 + 0,0313x - 7,33E-5x^2$

A partir de esta ecuación se generan los datos obtenidos en la tabla N° 92.

TABLA N° 92: RESULTADOS DE BIOMASA OBTENIDOS POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	LnX	Biomasa (g/L)
0	-2,740	0,065
24	-2,031	0,131
48	-1,406	0,245
72	-0,866	0,420
96	-0,411	0,663
120	-0,040	0,961
144	0,247	1,281
168	0,450	1,568
192	0,567	1,764
213,50	0,601	1,825
216	0,601	1,825

TABLA Nº 93: CALCULO DE GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 3.

X_i	X_{max}	$X_p = X_{max} - X_i$	$\%X_p = (X_p/X_{max}) \cdot 100$
0.065	1.825	1.760	96.46

Donde:

X_i : Concentración inicial de biomasa (g/L).

X_{max} : Concentración máxima de biomasa (g/L).

X_p : Cantidad de biomasa generada (g/L).

$\%X_p$: Generación porcentual de biomasa (%).

La curva 2 de la figura Nº 89 muestra el comportamiento que experimenta la generación de biomasa a lo largo del proceso fermentativo. En dicha gráfica, se observa que la biomasa va en aumento desde las cero horas y alcanza una concentración máxima a las 213.50 horas, dicha concentración representa un aumento porcentual en biomasa de un 96.46 por ciento. Dado lo anterior y si consideramos que la biomasa es aproximadamente constante entre las 204 y 216 horas, podemos identificar en la gráfica dos fases características del crecimiento microbiano en un cultivo por lotes, entonces tenemos que la fase de crecimiento se da en el periodo comprendido de cero a 204 horas del proceso y la fase estacionaria que se observa entre las 204 y 216 horas.

5.3.3.2 Rapidez especifica de crecimiento (μ).

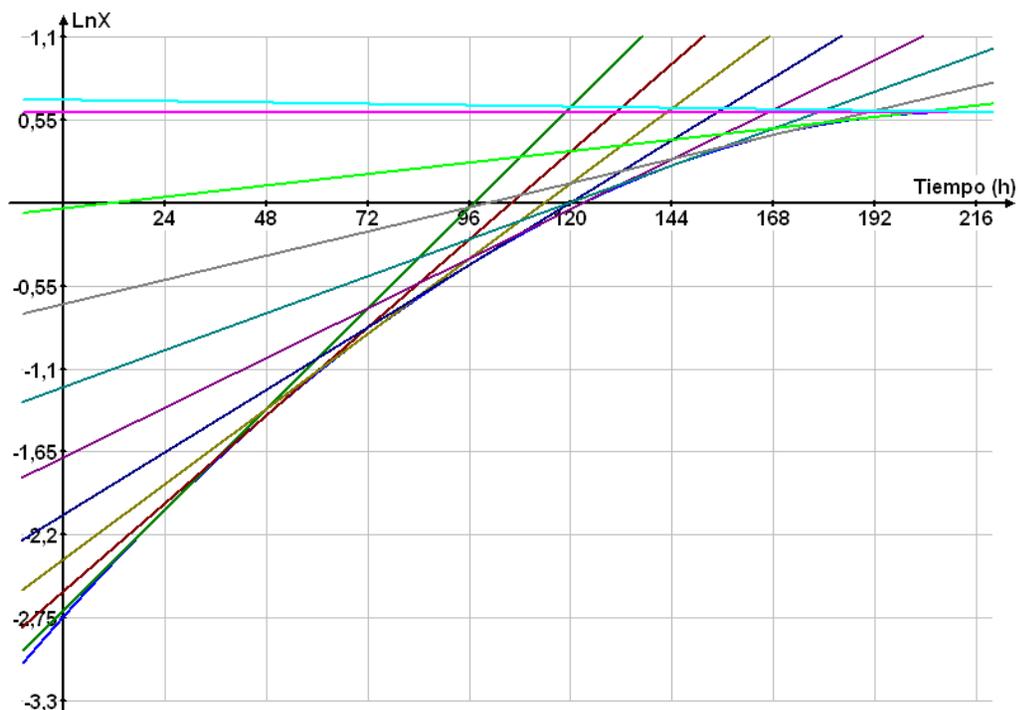


Figura N° 90: Rectas tangentes a la curva idealizada LnX Vrs tiempo. Ensayo 3.

La figura N° 90 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada " LnX Vrs tiempo" (Curva 2: figura N° 89), en donde las pendientes de dichas rectas representan la rapidez especifica de crecimiento en un punto especifico a lo largo del proceso.

TABLA Nº 94: RESULTADOS DE RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA Nº 99.

Tiempo (h)	μ (1/h)
24	0,0278
48	0,0243
72	0,0207
96	0,0172
120	0,0137
144	0,0102
168	0,0067
192	0,0032
213,50	0,0000
216	-0,0004

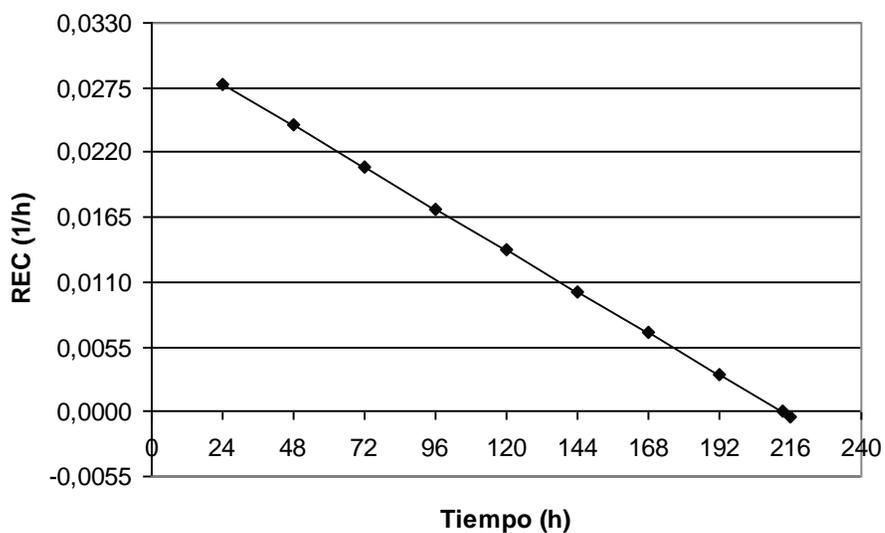


Figura Nº 91: Gráfico de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.

En la Figura N° 91 se observan las variaciones de la rapidez específica de crecimiento a lo largo del proceso. En dicha gráfica se observa que la mayor tasa de crecimiento por unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento y va disminuyendo en forma constante a medida avanza el proceso, hasta que toma un valor igual a cero a las 213.50 hora, es en este punto donde la curva 2 de la gráfica N° 89 presenta su máximo, en dicho punto la velocidad de lisis celular es igual a la velocidad de generación celular, lo que indica que la biomasa se mantiene aproximadamente constante en los puntos cercanos a la recta tangente al punto máximo.

5.3.3.3 Consumo de sustrato. Determinación de azúcares totales por el método de Fenol – Sulfúrico.

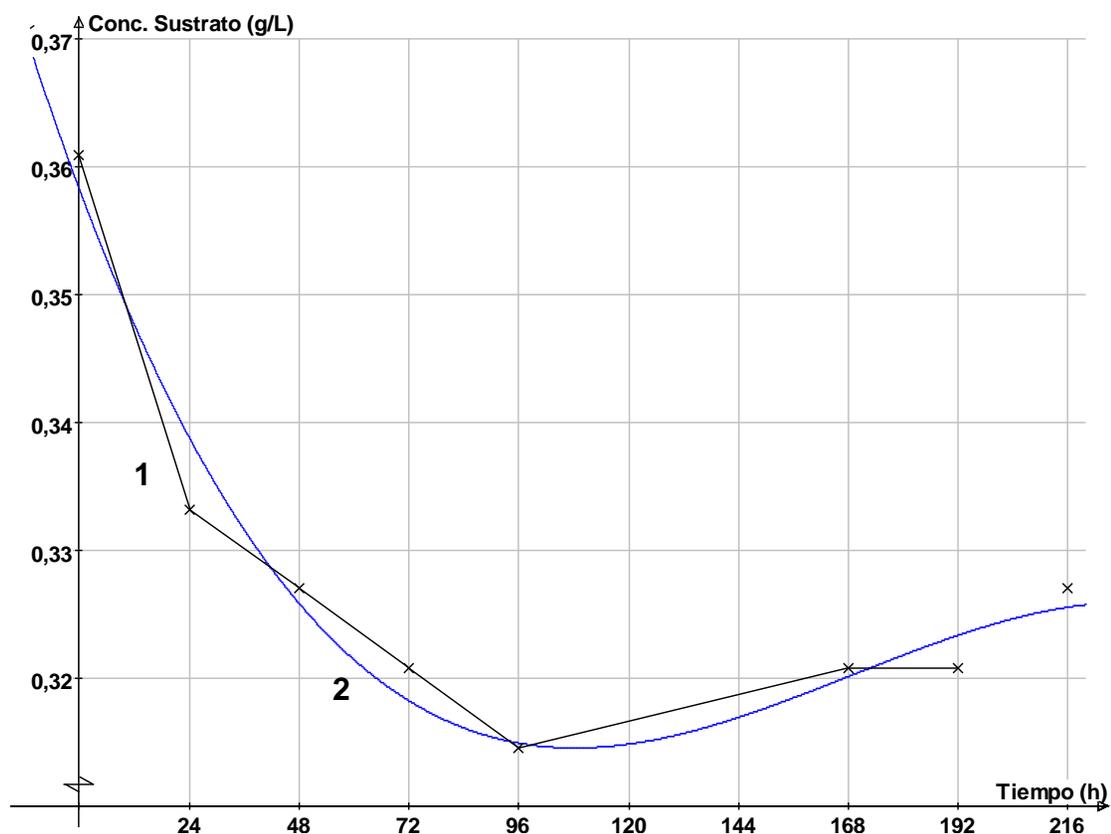


Figura Nº 92: Regresión polinomial de Gráfica Concentración de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 92 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indica el valor mínimo de concentración de sustrato (circulo rojo). Dicha gráfica es representada por la ecuación:

$$y=0,358 - 0,000958x + 6,52E-6x^2 - 1,29E-8x^3$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla N° 95.

TABLA N° 95: RESULTADOS DE AZÚCARES TOTALES OBTENIDOS POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)
0	0,3580
24	0,3386
48	0,3256
72	0,3180
96	0,3147
108,23	0,3143
120	0,3146
144	0,3167
168	0,3199
192	0,3231
216	0,3253

TABLA Nº 96: CALCULO DEL CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 3.

Si	Smin	Sc = Si - Smin	%Sc = (Sc/Si).100
0.3580	0.3143	0.0437	12.20

Donde:

Si: Concentración inicial de sustrato (g/L).

Smin: Concentración mínima de sustrato observada (g/L).

Sc: Cantidad de sustrato consumido (g/L).

%Sc: Consumo porcentual de sustrato (%).

La curva 2 de la figura Nº 92 muestra el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato a lo largo del proceso, en dicha gráfica se observa que la concentración de sustrato va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar una concentración mínima a las 108.23 horas del proceso, dicha concentración representa un consumo del 12.20 por ciento del sustrato. A partir de las 108.23 horas se observa un incremento en la concentración de sustrato, lo cual se debe al efecto de la liberación de azúcares de la celulosa.

5.3.3.4 Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (QS).

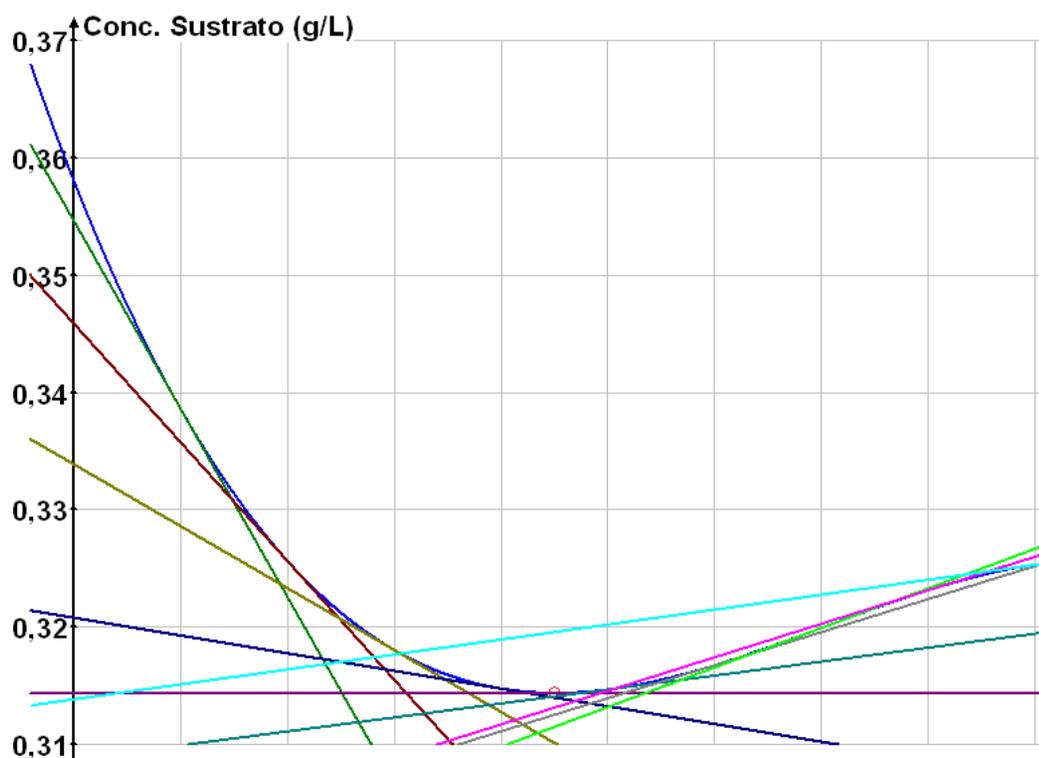


Figura N° 93: Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3.

La Figura N° 93 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada "concentración de sustrato Vrs tiempo" (Curva 2: figura N° 92), en donde el negativo de las pendientes de dichas rectas representan la rapidez volumétrica de consumo de sustrato en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 97: RESULTADOS DE RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 93.

Tiempo (h)	m	QS = -m
24	-0,000667	0,000667
48	-0,000421	0,000421
72	-0,000220	0,000220
96	-0,000063	0,000063
108,23	0,000000	0,000000
120	0,000050	-0,000050
144	0,000117	-0,000117
168	0,000140	-0,000140
192	0,000119	-0,000119
216	0,000053	-0,000053

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada consumo de sustrato Vrs Tiempo.

QS: Rapidez volumétrica de consumo de sustrato (g/L.h).

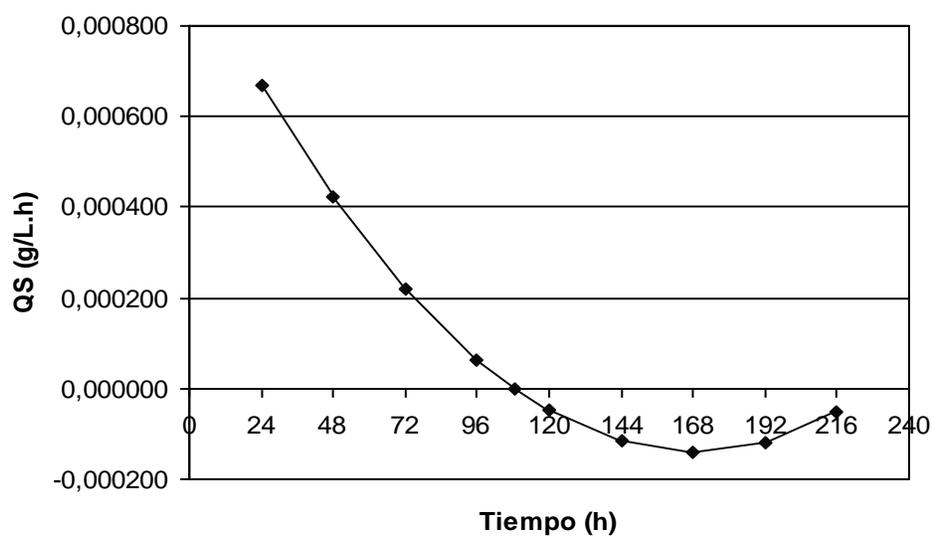


Figura N° 94: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3 idealizado.

En la figura N° 94 se observan las variaciones de la rapidez volumétrica de consumo de sustrato a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que el mayor consumo de sustrato por litro de medio de producción en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso, hasta tomar valores negativos después de las 108.23 horas, estos valores negativos de QS se deben a que ha habido un aumento en la concentración de sustrato en esos puntos. QS es igual a cero cuando la concentración de azúcares deja de disminuir, es decir, a partir de este punto no hay consumo aparente de sustrato.

5.3.3.5 Rapidez especifica de consumo de sustrato (qs).

TABLA Nº 98: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO. ENSAYO 3 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	m	X	1/X	qs = -m.1/X
24	-0,000667	0,131	7,63	5,09E-03
48	-0,000421	0,245	4,08	1,72E-03
72	-0,000220	0,420	2,38	5,24E-04
96	-0,000063	0,663	1,51	9,47E-05
108,23	0,000000	0,810	1,23	0,00E+00
120	0,000050	0,961	1,04	-5,15E-05
144	0,000117	1,281	0,78	-9,13E-05
168	0,000140	1,568	0,64	-8,93E-05
192	0,000119	1,764	0,57	-6,75E-05
216	0,000053	1,825	0,55	-2,91E-05

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada consumo de sustrato Vrs tiempo.

X: Concentración de biomasa (g/L).

qs: Rapidez especifica de consumo de sustrato (g/g.h).

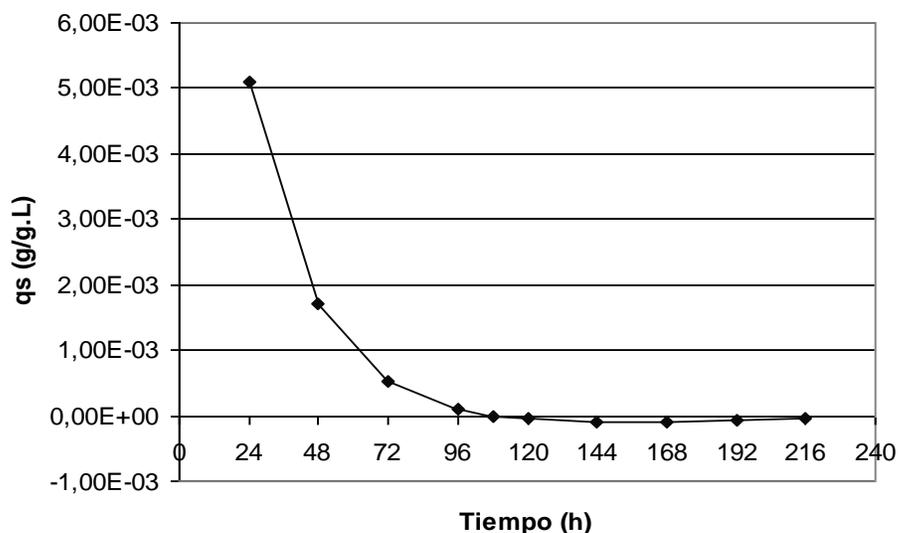


Figura N° 95: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.

En la figura N° 95 se observan las variaciones de la rapidez específica de consumo de sustrato a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que el mayor consumo de sustrato por gramo de biomasa en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso. Según puede observarse en la gráfica, la razón de cambio de q_s va disminuyendo a medida el ciclo de crecimiento se acerca a la fase estacionaria, dicho de otra forma, q_s disminuye a medida que la tasa de crecimiento tiende a cero.

5.3.3.6 Formación de producto. Cuantificación de riboflavina por el método del Hidrosulfito de Sodio.

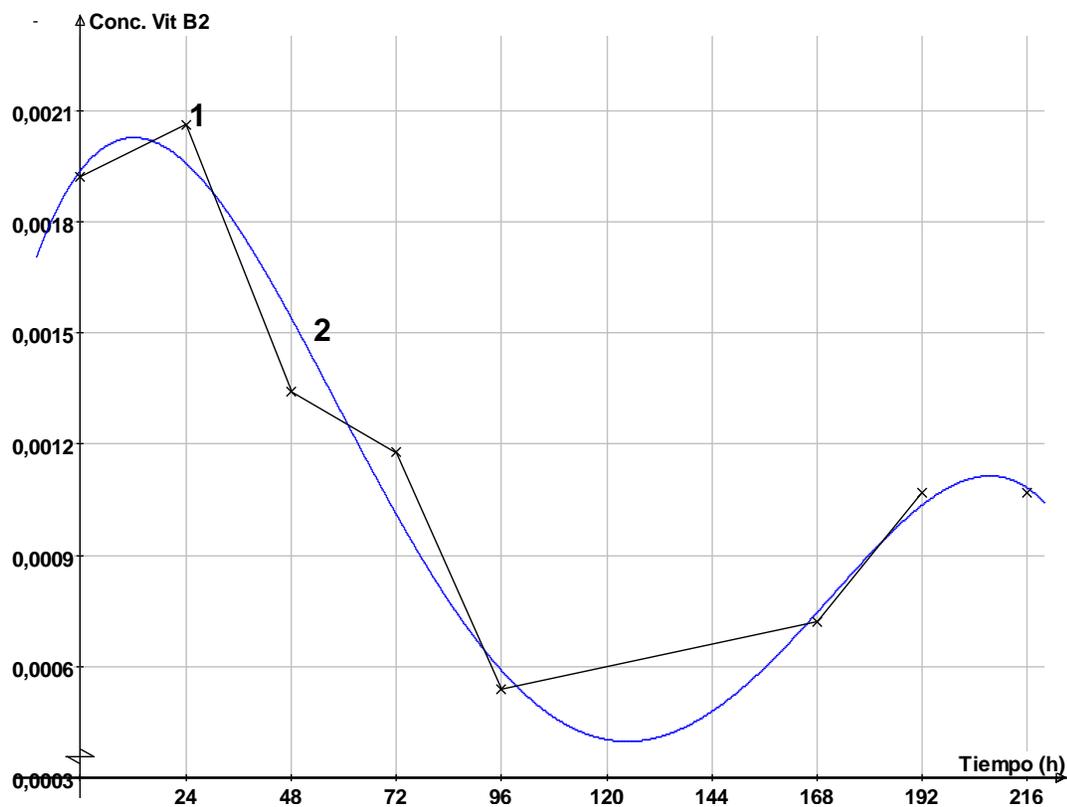


Figura N° 96: Regresión polinomial de Gráfica Concentración de Riboflavina Vrs Tiempo. Ensayo 3.

Curva 1: corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva 2: Se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a la curva 1 (idealización).

La curva 2 de la figura N° 96 es la idealización de los resultados obtenidos experimentalmente, en ella se indican máximos y mínimos (círculos rojos).

Dicha gráfica se representa por la ecuación:

$$y = 0,00194 + 1,53E-5x - 7,36E-7x^2 + 5,66E-9x^3 - 1,23E-11x^4$$

A partir de esta ecuación se generan los resultados obtenidos en la tabla N° 99.

TABLA N° 99: CONCENTRACIÓN DE RIBOFLAVINA OBTENIDA POR APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESION POLINOMIAL. ENSAYO 3. (CERO - 22.5 HORAS).

Tiempo (h)	Conc. Vitamina B2 (g/L)
0	1,9400E-03
2,5	1,9737E-03
5	1,9988E-03
7,5	2,0157E-03
10	2,0249E-03
11,99	2,0271E-03
12,5	2,0270E-03
15	2,0224E-03
17,5	2,0115E-03
20	1,9949E-03
22,5	1,9730E-03

TABLA N° 100: CALCULO DEL PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE RIBOFLAVINA A PARTIR DE DATOS IDEALIZADOS. ENSAYO 3.

Si	Smax	Sp = Smax - Si	%Pp = (Xp/Xmax).100
1.9400E-03	2.0271E-03	8.7141E-05	4.30

Donde:

Pi: Concentración inicial de riboflavina (g/L).

Pmax: Concentración máxima de riboflavina observada (g/L).

Pp: Cantidad de riboflavina Producida (g/L).

%Pp: Porcentaje de producción de riboflavina (%).

La curva 2 de la figura N° 96 muestra el comportamiento que experimenta la formación de producto, en dicha gráfica se observa que la concentración de riboflavina va aumentando a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar una concentración máxima a las 11.99 horas del proceso, dicha concentración representa un aumento porcentual en riboflavina de un 4.30 por ciento. A partir de las 11.99 horas se observa un decremento en la concentración de riboflavina, lo cual se debe probablemente al uso de la flavina mononucleótido de la riboflavina como cofactor enzimático.

5.3.3.7 Rapidez volumétrica de formación de producto (QP).

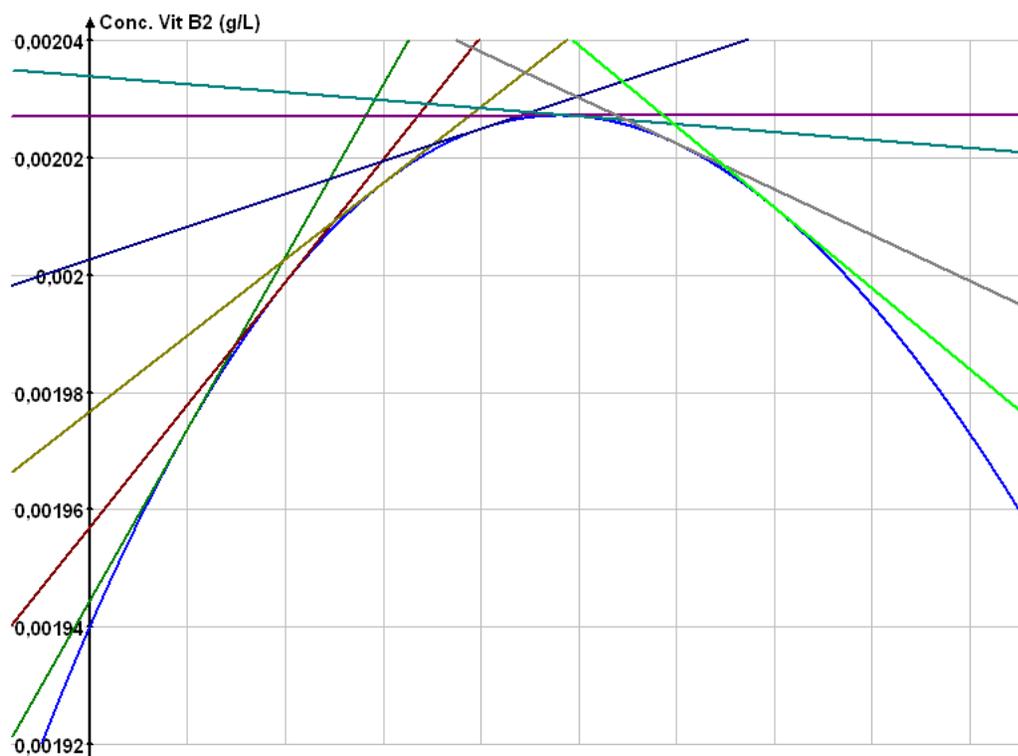


Figura N° 97: Rectas tangentes a la curva idealizada Concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Ensayo 3. (Cero – 22.5 horas).

La figura N° 97 muestra las rectas tangentes a los diferentes tiempos en la curva idealizada "concentración de Riboflavina Vrs tiempo" (Curva 2: figura N° 96), en donde las pendientes de dichas rectas representan la rapidez volumétrica de formación de producto en un punto específico a lo largo del proceso.

TABLA N° 101: RESULTADOS DE RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO OBTENIDOS A PARTIR DE LA FIGURA N° 97.

Tiempo (h)	QP (g/L.h)
2,5	1,17E-05
5	8,36E-06
7,5	5,19E-06
10	2,23E-06
11,99	0,00E+00
12,5	-5,43E-07
15	-3,13E-06
17,5	-5,52E-06

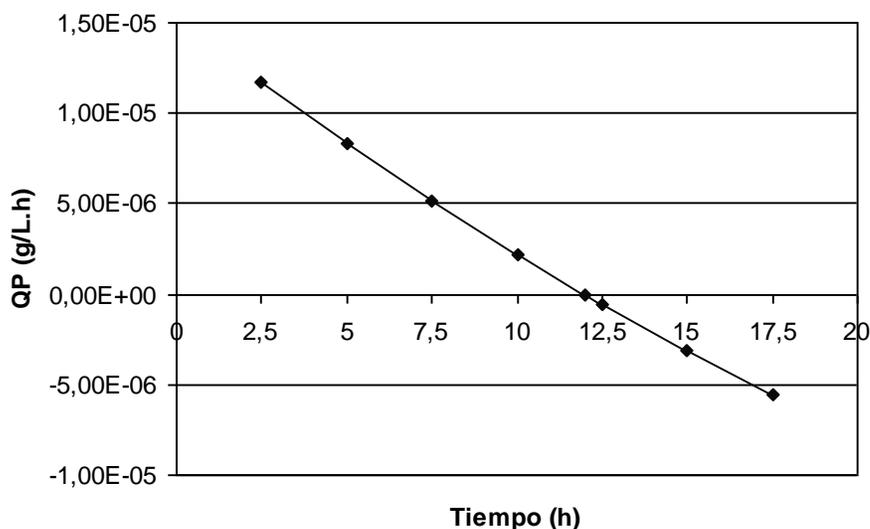


Figura N° 98: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.

En la figura N° 98 se observan las variaciones de la rapidez volumétrica formación de producto a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que la mayor formación de producto por litro de medio de producción

en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo de forma constante conforme avanza el proceso, hasta tomar valores negativos después de las 11.99 horas, estos valores negativos de QP se deben a que ha habido una disminución en la concentración de riboflavina en esos puntos. QP es igual a cero cuando la producción de riboflavina se detiene, es decir, a partir de este punto no hay producción de riboflavina.

5.3.3.8 Rapidez específica de Formación de producto (qp).

TABLA Nº 102: CALCULO DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 3 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	m	X	1/X	qp = m.1/X
2,5	1,17E-05	0,070	14,29	1,67E-04
5	8,36E-06	0,075	13,33	1,11E-04
7,5	5,19E-06	0,081	12,35	6,41E-05
10	2,23E-06	0,088	11,36	2,53E-05
11,99	0,00E+00	0,093	10,75	0,00E+00
12,5	-5,43E-07	0,094	10,64	-5,78E-06
15	-3,13E-06	0,101	9,90	-3,10E-05
17,5	-5,52E-06	0,110	9,09	-5,02E-05

Donde:

m: Pendiente de las rectas tangentes a la curva idealizada formación de producto Vrs tiempo.

X: Concentración de biomasa (g/L).

qp: Rapidez específica de formación de producto (g/g.h).

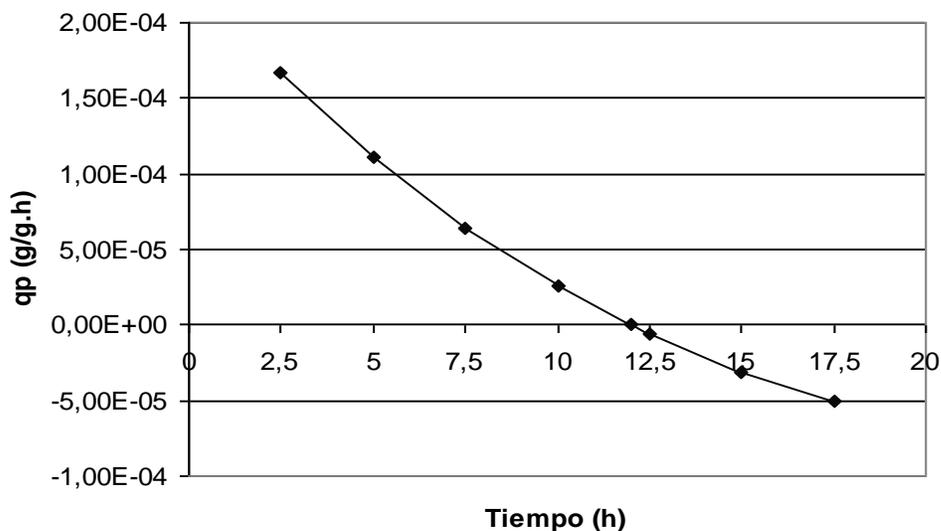


Figura N° 99: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Ensayo 3 idealizado.

En la figura N° 99 se observan las variaciones de la rapidez específica de formación de producto a lo largo del proceso de producción. En dicha gráfica se observa que la mayor formación de producto por gramo de biomasa en la unidad de tiempo se da en los inicios de la fase de crecimiento, y va disminuyendo conforme avanza el proceso. Según puede observarse en la gráfica, la razón de cambio de qp va disminuyendo a medida el ciclo de crecimiento se acerca a la fase estacionaria, dicho de otra forma, qp disminuye a medida que la tasa de crecimiento tiende a cero.

5.3.3.9 Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$).

Como se observo anteriormente (en los cálculos a partir de datos experimentales) no es posible calcular $Y_{x/s}$ cuando no hay consumo de sustrato medible o cuando hay una disminución en la biomasa, entonces solo se consideraran para su calculo los periodos donde se observe un consumo de sustrato acompañado de la respectiva generación de biomasa.

TABLA Nº 103: CONSUMO DE SUSTRATO Y GENERACION DE BIOMASA. ENSAYO 3 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)
0	0,3580	0,065
24	0,3386	0,131
48	0,3256	0,245
72	0,3180	0,420
96	0,3147	0,663
108,23	0,3143	0,810

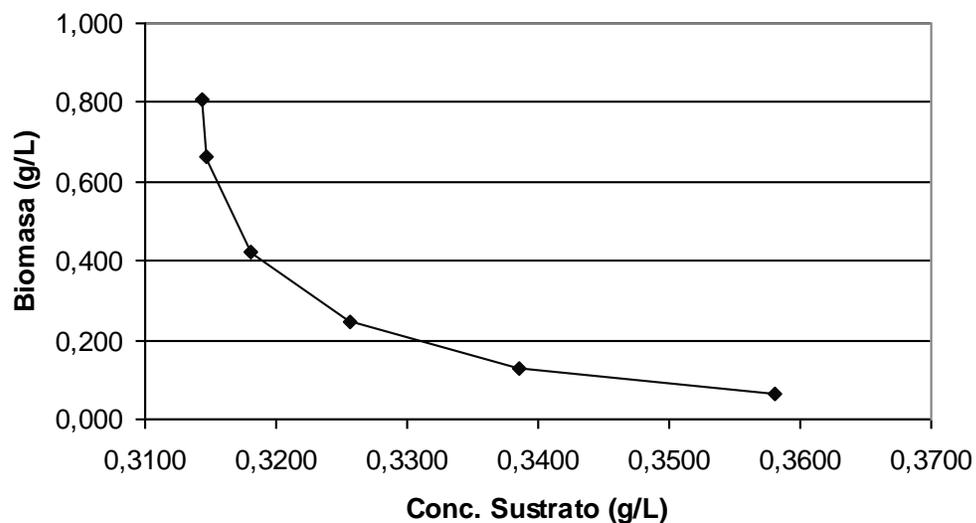


Figura N° 100: Gráfica de biomasa Vrs Concentración de sustrato. Ensayo 3 idealizado.

La figura N° 100 Corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos de la aplicación de las respectivas ecuaciones de regresión polinomial a los datos experimentales de biomasa y concentración de sustrato (tabla N° 103). En dicha gráfica se muestra la relación que existe entre la cantidad de biomasa que se genera y la cantidad de sustrato que se consume. Como puede observarse la cantidad de biomasa aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA N° 104: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 3(TABLA N° 103).

Tiempo (h)	Si	Sf	Xi	Xf	$Y_{x/s} = -(X_f - X_i)/(S_f - S_i)$
0	-	0,3580	-	0,065	-
24	0,3580	0,3386	0,065	0,131	3,40
48	0,3386	0,3256	0,131	0,245	8,77
72	0,3256	0,3180	0,245	0,420	23,03
96	0,3180	0,3147	0,420	0,663	73,64
108,23	0,3147	0,3143	0,663	0,810	367,50

Donde:

Xi: Concentración inicial de biomasa (g/L).

Xf: Concentración final de biomasa (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

Y_{x/s}: Coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato (g/g).

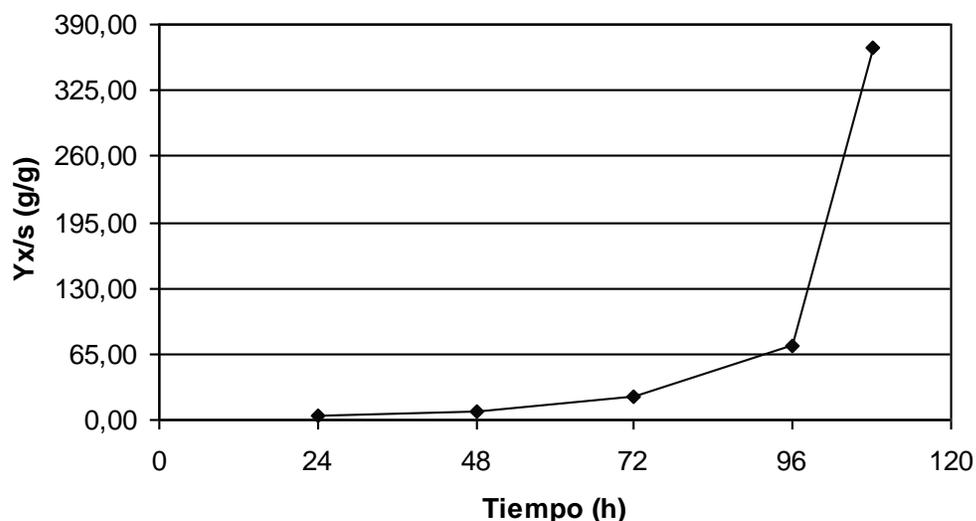


Figura N° 101: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3 idealizado.

La figura N° 101 representa la eficacia de conversión del sustrato en biomasa. Dicho de otra forma, representa la cantidad de biomasa formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa como $Y_{x/s}$ aumenta a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar su mayor valor a las 108.23 horas del proceso.

5.3.3.10 Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$).

Como se observó anteriormente (en los cálculos a partir de datos experimentales) no es posible calcular $Y_{p/s}$ cuando no hay consumo de sustrato medible o cuando hay una disminución en la concentración de producto, entonces solo se consideraran para su cálculo los periodos donde se observe un consumo de sustrato acompañado de la respectiva formación de producto.

TABLA Nº 105: CONSUMO DE SUSTRATO Y FORMACIÓN DE PRODUCTO. ENSAYO 3 IDEALIZADO.

Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Conc. Riboflavina (g/L)
0	0,3580	0,001940
2,5	0,3556	0,001974
5	0,3534	0,001999
7,5	0,3512	0,002016
10	0,3491	0,002025
11,99	0,3474	0,002027

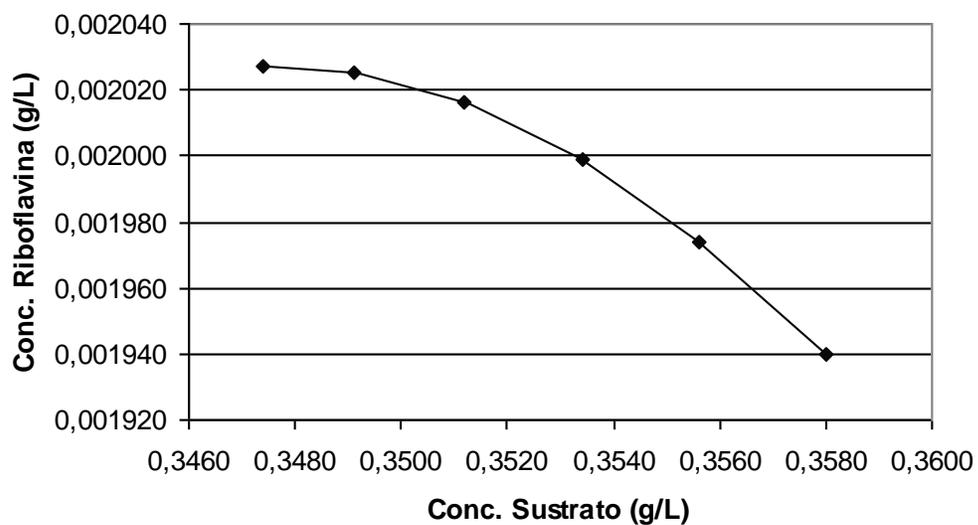


Figura Nº 102: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs concentración de sustrato. Ensayo 3 idealizado.

La figura Nº 102 Corresponde a la gráfica de los resultados obtenidos de la aplicación de las respectivas ecuaciones de regresión polinomial a los datos experimentales de concentración de Riboflavina y concentración de sustrato

(tabla N° 105). En dicha gráfica se muestra la relación que existe entre la cantidad de Riboflavina que se produce y la cantidad de sustrato que se consume. Como puede observarse la concentración de Riboflavina aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye.

TABLA N° 106: CALCULO DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO OBTENIDOS A PARTIR DE RESULTADOS IDEALIZADOS DE ENSAYO 3 (TABLA N° 105)

Tiempo (h)	Si	Sf	Pi	Pf	$Yp/s = -(Pf - Pi)/(Sf - Si)$
0	-	0,3580	-	0,001940	-
2,5	0,3580	0,3556	0,001940	0,001974	0,0142
5	0,3556	0,3534	0,001974	0,001999	0,0114
7,5	0,3534	0,3512	0,001999	0,002016	0,0077
10	0,3512	0,3491	0,002016	0,002025	0,0043
11,99	0,3491	0,3474	0,002025	0,002027	0,0012

Donde:

Pi: Concentración inicial de Riboflavina (g/L).

Pf: Concentración final de Riboflavina (g/L).

Si: Concentración inicial sustrato (g/L).

Sf: Concentración final de sustrato (g/L).

YP/s: Coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato (g/g).

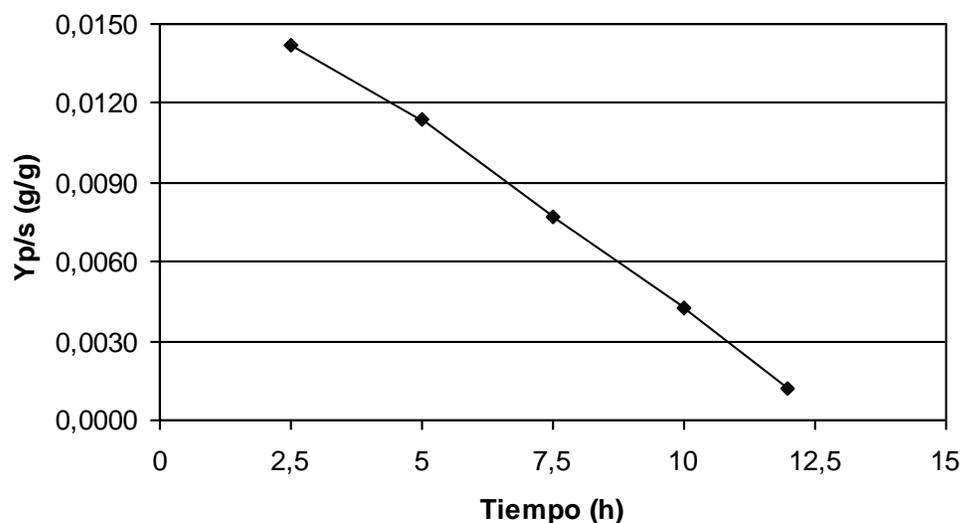


Figura N° 103: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs Tiempo. Ensayo 3 idealizado.

La figura N° 103 representa la eficacia de conversión del sustrato en riboflavina. Dicho de otra forma, representa la cantidad de riboflavina formada por cada gramo de sustrato consumido. En dicha gráfica se observa que la mayor conversión de sustrato en riboflavina se da en los inicios de la fase de crecimiento, $Y_{p/s}$ va disminuyendo a medida transcurre el tiempo, hasta alcanzar su valor mínimo a las 11.99 horas del proceso. El consumo de sustrato medible después de este punto es utilizado para la generación de biomasa y/o para el mantenimiento de las funciones vitales de la célula,

5.4 Comparación de resultados idealizados en 3 ensayos de cinética de crecimiento y producción de riboflavina.

Según los modelos propuestos en el capítulo 5.3, podemos observar que la biomasa aumenta a medida que la concentración de sustrato disminuye, la figura N° 104 nos muestra esta relación en cada uno de los 3 ensayos.

TABLA N° 107: CONSUMO DE SUSTRATO Y GENERACION DE BIOMASA EN 3 ENSAYOS IDEALIZADOS.

Tiempo (h)	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	Biomasa (g/L)	C. Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)	C. Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)	C. Sustrato (g/L)
0	0,062	0,3330	0,061	0,3180	0,065	0,3580
24	0,107	0,2988	0,267	0,2936	0,131	0,3386
48	0,268	0,2710	0,690	0,2769	0,245	0,3256
72	0,678	0,2493	1,171	0,2660	0,420	0,3180
96	1,352	0,2333	1,446	0,2591	0,663	0,3147
120	1,887	0,2229	-	-	-	-
106,47	-	-	1,472	0,2569	-	-
108,23	-	-	-	-	0,810	0,3143
130,36	1,946	0,2201	-	-	-	-

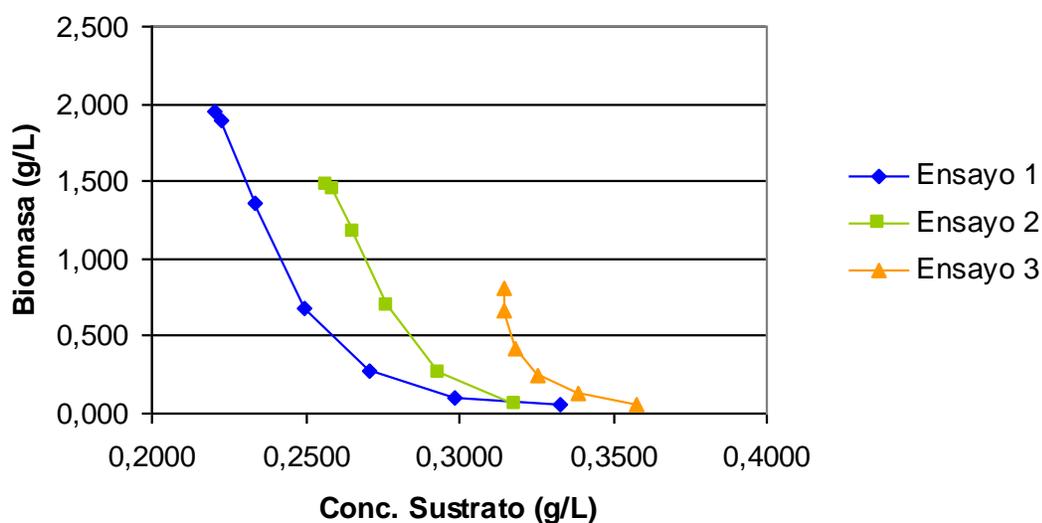


Figura N° 104: Gráfica comparativa de biomasa Vrs concentración de Sustrato para 3 ensayos idealizados.

Sin embargo, la cantidad de sustrato consumido no necesariamente es proporcional a la cantidad de biomasa generada. Así lo observamos si comparamos los porcentajes de biomasa generada (figura N° 105) y el consumo porcentual de sustrato (figura N° 106) de cada ensayo, en donde la cantidad de biomasa generada en el ensayo 2 es menor que la generada en el ensayo 3 a pesar de que el consumo de sustrato es mayor en el ensayo 2.

TABLA N° 108: CONCENTRACIONES MAXIMAS Y GENERACION PORCENTUAL DE BIOMASA DE 3 ENSAYOS IDEALIZADOS.

	Tiempo (h)	Conc. Máxima de Biomasa (g/L)	Generación porcentual de biomasa (%)
Ensayo 1	130,36	1,946	96,81
Ensayo 2	106,47	1,472	95,83
Ensayo 3	213,50	1,825	96,46

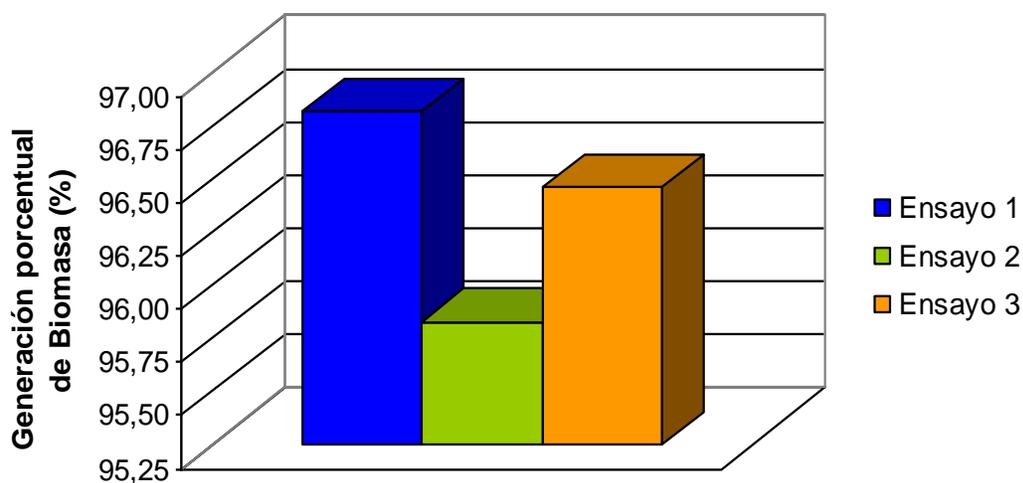


Figura N° 105: Gráfico comparativo de generación porcentual de biomasa para 3 ensayos idealizados.

TABLA N° 109: CONCENTRACION MINIMA DE SUSTRATO Y CONSUMO PORCENTUAL DE SUSTRATO PARA 3 ENSAYOS IDEALIZADOS.

	Tiempo (h)	Conc. mínima de sustrato (g/L)	Consumo porcentual de sustrato (%)
Ensayo 1	156,56	0,2172	34,79
Ensayo 2	216	0,2206	30,63
Ensayo 3	108,23	0,3143	12,20

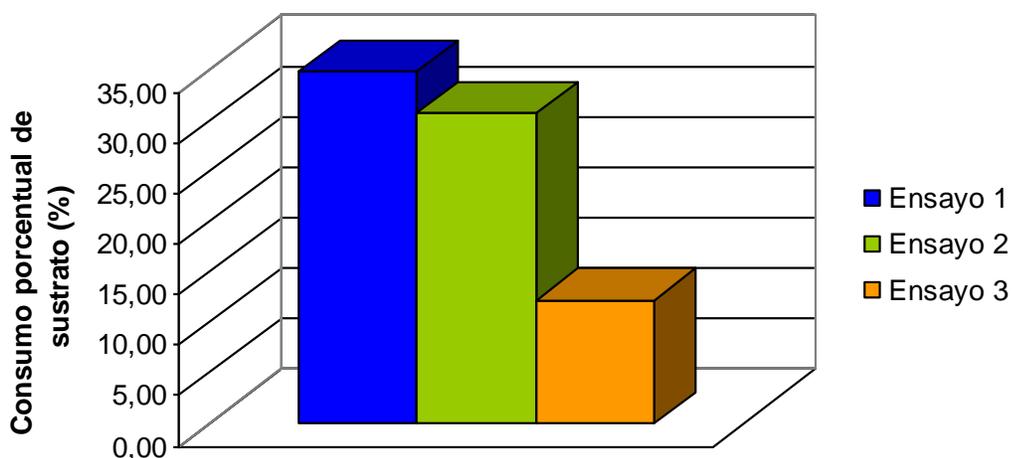


Figura N° 106: Gráfico comparativo de consumo porcentual de sustrato para 3 ensayos idealizados.

La relación inversa observada entre el consumo de sustrato y generación de biomasa en los ensayos 2 y 3 probablemente se debe a la adición de sales inorgánicas al medio de producción (ensayo 3), ya que el nitrógeno es uno de los componentes principales del material celular (NH_4^+ adicionado al medio en forma de sulfato de amonio), el cual con frecuencia es el sustrato preferido, junto con los iones fosfato como fuente de fósforo (adicionado al medio en

forma de fosfato trisódico), el cual es un componente de los ácidos nucleicos y del ATP. ⁽⁸⁾ Entonces tenemos que ambos elementos (nitrógeno y fósforo) potencian las vías anabólicas que dan lugar a la construcción de nuevo material celular, optimizando de esta forma el consumo de sustrato, dicho de otra forma, el metabolismo intracelular reacciona de manera tal que la mayor parte del sustrato consumido (azúcares totales) es destinado a la construcción de nuevo material celular, dando como resultado una mayor cantidad de biomasa por gramo de sustrato consumido. Este fenómeno se hace evidente al comparar los coeficientes de rendimientos de biomasa para cada ensayo (figura N° 107), en donde claramente vemos que los mayores rendimientos de biomasa sobre sustrato se dan en el ensayo 3.

TABLA N° 110: RESULTADOS DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	Yx/s (g/g)	Yx/s (g/g)	Yx/s (g/g)
24	1,32	8,44	3,40
48	5,79	25,33	8,77
72	18,89	44,13	23,03
96	42,13	39,86	73,64
106,47	-	11,82	-
108,23	-	-	367,50
120	51,44	-	-
130,36	21,07	-	-
195	-	2,19	-
200	-	6,08	-
205	-	9,17	-
210	-	12,61	-
216	-	15,93	-

TABLA Nº 111: MAXIMOS OBTENIDOS EN LOS COEFICIENTES DE RENDIMIENTO DE BIOMASA SOBRE SUSTRATO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Tiempo (h)	Yx/s máximo (g/g)
Ensayo 1	120	51.44
Ensayo 2	72	44.13
Ensayo 3	108,23	367.50

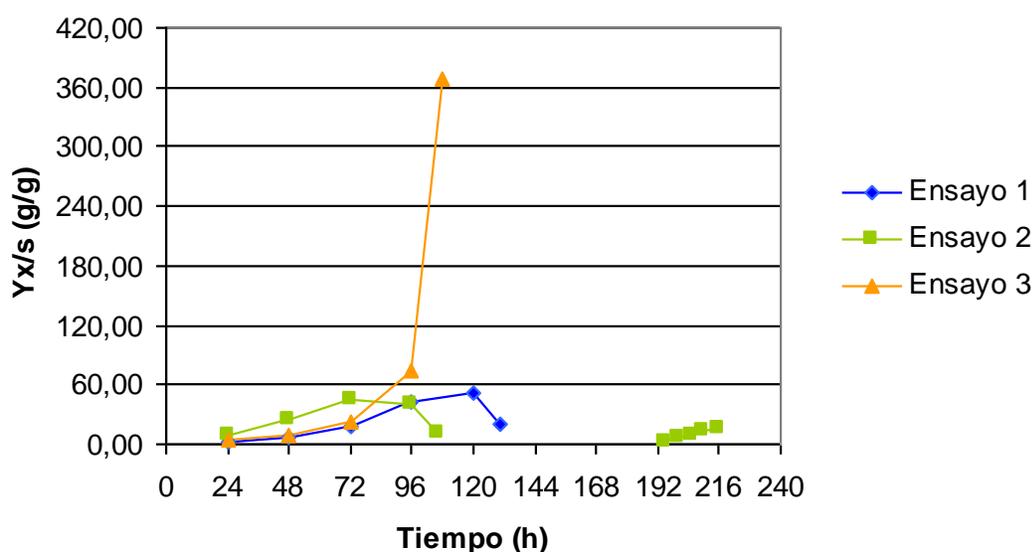


Figura Nº 107: Gráfica de coeficiente de rendimiento de biomasa sobre sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Ahora bien, puesto que gracias a la optimización de las vías anabólicas se requiere una menor cantidad de sustrato (azúcares totales) para generar biomasa, esto se traducirá a su vez en una baja en el consumo de sustrato, lo cual es evidente si comparamos las velocidades volumétricas de consumo

(figura N° 108), en donde efectivamente el ensayo 3 presenta las velocidades mas bajas.

TABLA N° 112: RESULTADOS DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	QS (g/L.h)	QS (g/L.h)	QS (g/L.h)
24	0,001290	0,000843	0,000667
48	0,001030	0,000563	0,000421
72	0,000783	0,000358	0,000220
96	0,000546	0,000230	0,000063
120	0,000321	0,000178	-0,000050
144	0,000107	0,000201	-0,000117
168	-0,000095	0,000301	-0,000140
192	-0,000286	0,000477	-0,000119
216	-0,000466	0,000728	-0,000053

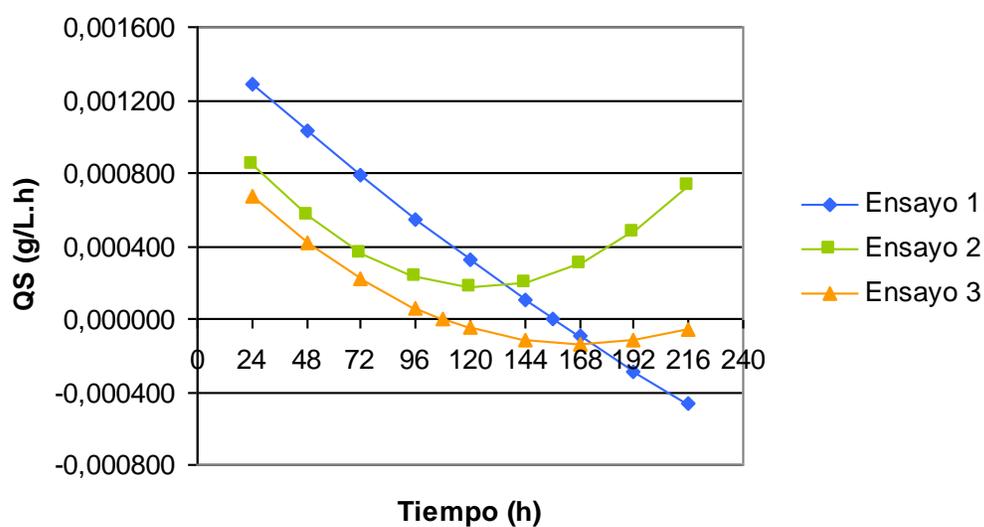


Figura N° 108: Gráfica de rapidez volumétrica de consumo de sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Según observamos en las figuras N° 108 y 109 las velocidades volumétricas y específicas de consumo de sustrato del ensayo 1 se mantienen por encima de los valores presentados en los ensayos 2 y 3, esto se debe a que a diferencia de los demás ensayos, en este ensayo el consumo de sustrato es directamente proporcional a la cantidad de biomasa generada.

TABLA N° 113: RESULTADOS DE LA RAPIDEZ ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	qs (g/g.h)	qs (g/g.h)	qs (g/g.h)
24	1,21E-02	3,16E-03	5,09E-03
48	3,84E-03	8,16E-04	1,72E-03
72	1,15E-03	3,06E-04	5,24E-04
96	4,04E-04	1,59E-04	9,47E-05
120	1,70E-04	1,24E-04	-5,15E-05
144	5,76E-05	1,58E-04	-9,13E-05
168	-6,46E-05	2,72E-04	-8,93E-05
192	-2,35E-04	4,53E-04	-6,75E-05
216	-3,02E-04	6,04E-04	-2,91E-05

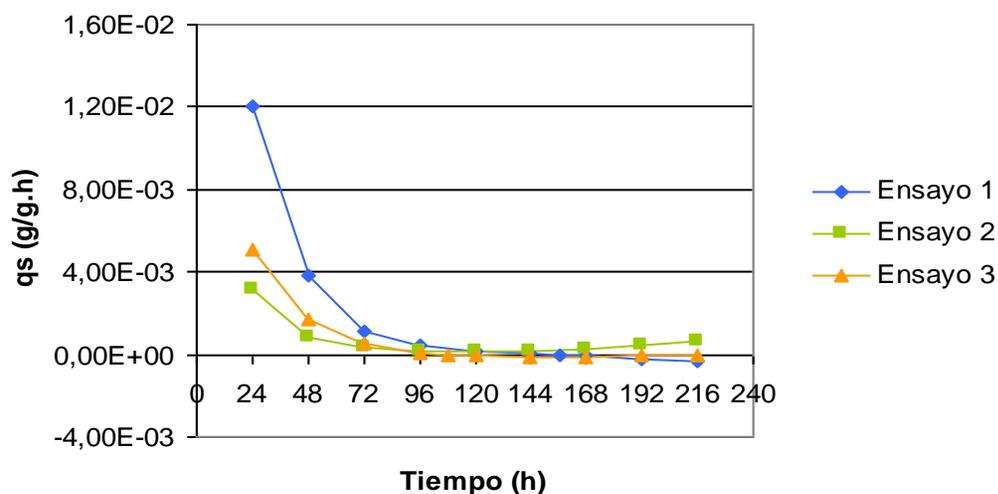


Figura N° 109: Gráfica de rapidez específica de consumo de sustrato V_r tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Ya que en el ensayo 3 se necesita menos sustrato para generar biomasa, esto significa que habrá mas sustrato disponible en el medio de producción, este fenómeno se observa claramente en la figura N° 110 en donde efectivamente la concentración de sustrato del ensayo 3 se mantiene por encima de los ensayos 1 y 2, lo cual se debe al poco consumo del mismo.

TABLA N° 114: CUANTIFICACION DE AZÚCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL – SULFÚRICO EN 3 ENSAYOS IDEALIZADOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	Conc. Sustrato (g/L)	Conc. Sustrato (g/L)	Conc. Sustrato (g/L)
0	0,3330	0,3180	0,3580
24	0,2988	0,2936	0,3386
48	0,2710	0,2769	0,3256
72	0,2493	0,2660	0,3180
96	0,2333	0,2591	0,3147
120	0,2229	0,2544	0,3146
144	0,2178	0,2500	0,3167
168	0,2177	0,2441	0,3199
192	0,2223	0,2349	0,3231
216	0,2314	0,2206	0,3253

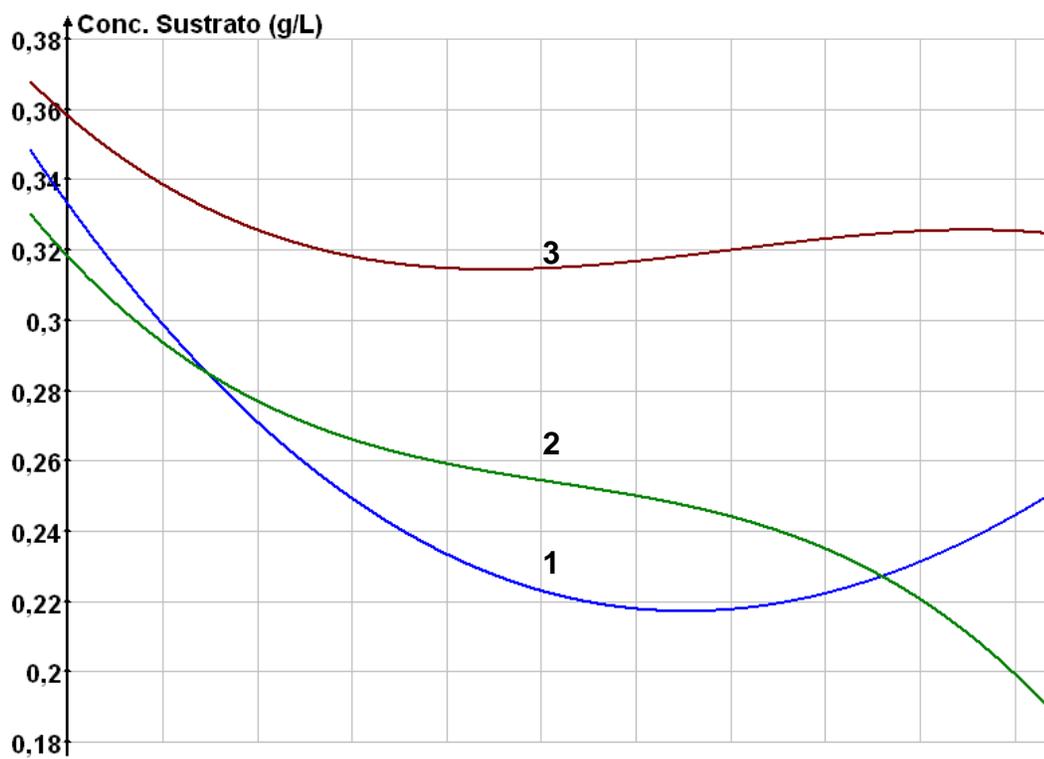


Figura Nº 110: Gráfica de concentración de sustrato (azúcares totales) Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Curva 1: Corresponde a la gráfica idealizada "Conc. Sustrato Vrs tiempo" del ensayo 1.

Curva 2: Corresponde a la gráfica idealizada "Conc. Sustrato Vrs tiempo" del ensayo 2.

Curva 3: Corresponde a la gráfica idealizada "Conc. Sustrato Vrs tiempo" del ensayo 3.

Ya que en el ensayo 3 el consumo de sustrato es mínimo, esto significa que habrá mas sustrato disponible para seguir generando nuevas células, dándose de esta manera un periodo de crecimiento mas largo con el consecuente retraso en la aparición de la fase estacionaria y de muerte, esto se observa

claramente en la figura N° 111 en donde los puntos en que las graficas "REC vrs Tiempo" se interceptan con el eje X representan el momento en el cual la velocidad de generación de células iguala a la velocidad de muerte (fase estacionaria), a partir de estos puntos la REC toma valores negativos, lo cual indica que se ha entrado en la fase de muerte, lo cual puede observarse en la figura N° 112.

TABLA N° 115: RESULTADOS DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE CRECIMIENTO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	μ (1/h)	μ (1/h)	μ (1/h)
24	0,0335	0,0497	0,0278
48	0,0406	0,0301	0,0243
72	0,0350	0,0147	0,0207
96	0,0217	0,0036	0,0172
120	0,0061	-0,0034	0,0137
144	-0,0065	-0,0061	0,0102
168	-0,0110	-0,0046	0,0067
192	-0,0021	0,0011	0,0032
216	0,0254	0,0110	-0,0004

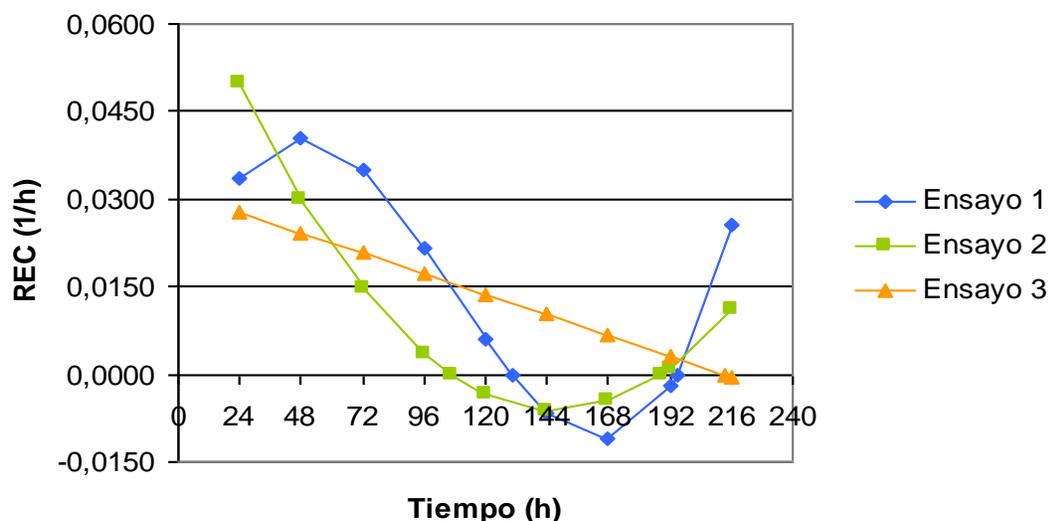


Figura N° 111: Gráfica de rapidez específica de crecimiento Vrs tiempo. comparación de 3 ensayos idealizados.

TABLA N° 116: CRECIMIENTO MICROBIANO POR EL METODO DEL PESO SECO EN 3 ENSAYOS IDEALIZADOS.

Tiempo (h)	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	LnX	Biomasa (g/L)	LnX	Biomasa (g/L)	LnX	Biomasa (g/L)
0	-2,780	0,062	-2,790	0,061	-2,740	0,065
24	-2,237	0,107	-1,320	0,267	-2,031	0,131
48	-1,316	0,268	-0,371	0,690	-1,406	0,245
72	-0,389	0,678	0,158	1,171	-0,866	0,420
96	0,301	1,352	0,369	1,446	-0,411	0,663
120	0,635	1,887	0,362	1,436	-0,040	0,961
144	0,619	1,857	0,239	1,271	0,247	1,281
168	0,387	1,472	0,102	1,107	0,450	1,568
192	0,197	1,218	0,050	1,052	0,567	1,764
216	0,434	1,544	0,187	1,205	0,601	1,824

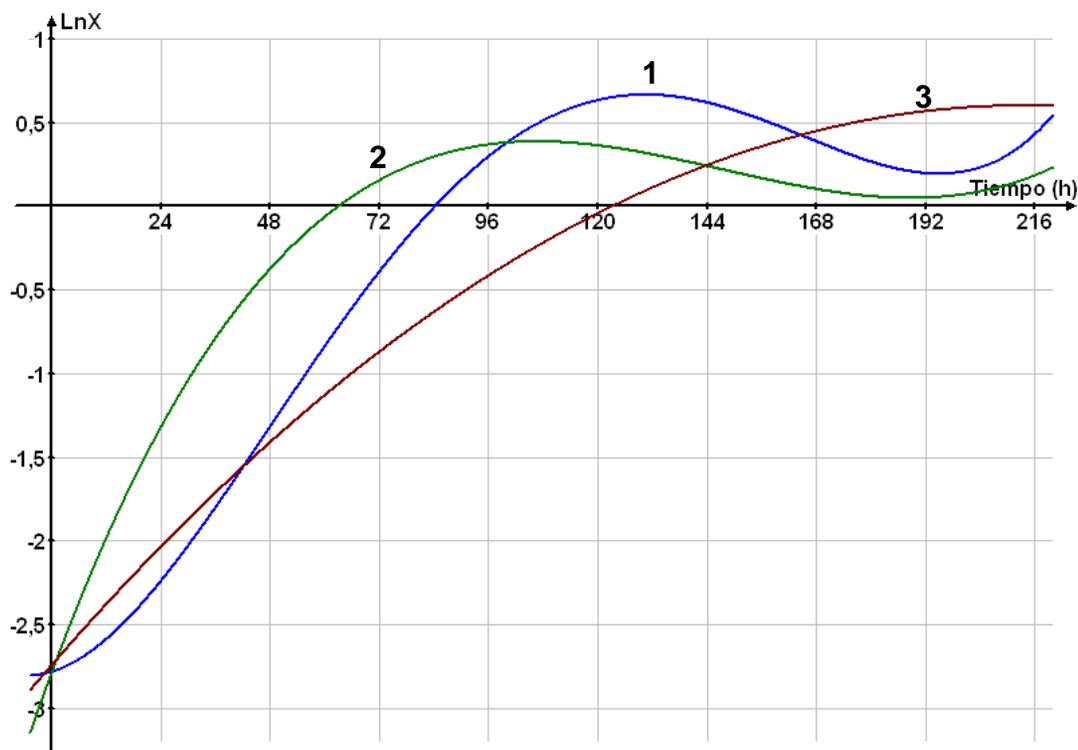


Figura N° 112: Gráfica de LnX Vrs Tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Curva 1: Corresponde a la gráfica idealizada "LnX Vrs tiempo" del ensayo 1.

Curva 2: Corresponde a la gráfica idealizada "LnX Vrs tiempo" del ensayo 2.

Curva 3: Corresponde a la gráfica idealizada "LnX Vrs tiempo" del ensayo 3.

Como ya se explicó anteriormente, la generación de biomasa por gramo de sustrato ($Y_{x/s}$) está determinada por el metabolismo intracelular, ahora bien, si este es afectado por la adición de un sustrato de forma tal que las vías metabólicas favorezcan la producción de biomasa, de manera inversa se verán afectadas las vías que favorecen la formación de producto por gramo de sustrato consumido. Podemos observar dicho fenómeno si comparamos la

generación porcentual de biomasa (figura N° 105) con el porcentaje de producción (figura N° 113), en donde observamos que efectivamente cuando el sistema se modifica de manera tal que favorezca la máxima producción de biomasa, esto tendrá como consecuencia un mínimo en formación de producto.

TABLA N° 117: CONCENTRACIONES MAXIMAS Y PORCENTAJES DE PRODUCCION OBTENIDOS EN 3 ENSAYOS IDEALIZADOS

	Tiempo (h)	Conc. Máxima de Riboflavina (g/L)	Porcentaje de producción (%)
Ensayo 1	33,31	1,9458E-03	4,92
Ensayo 2	14,29	2,2206E-03	13,54
Ensayo 3	11,99	2,0271E-03	4,30

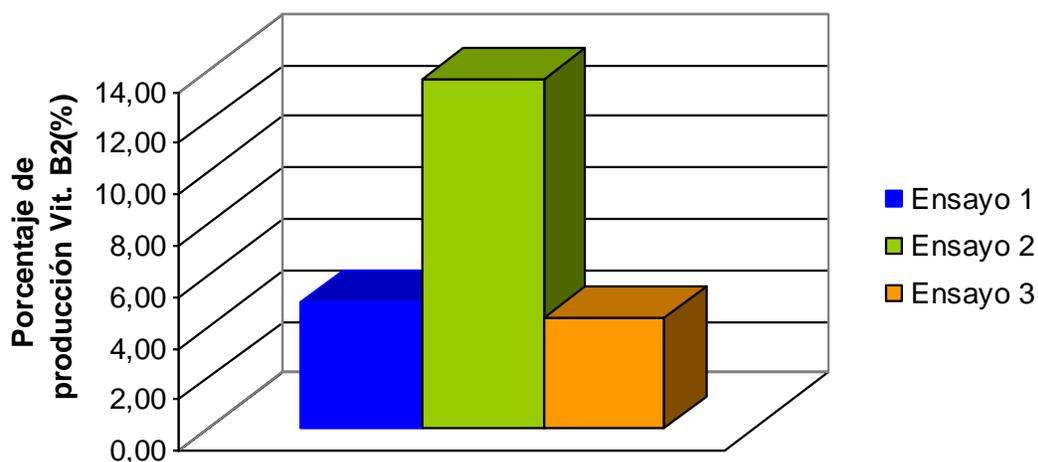


Figura N° 113: Gráfico comparativo de porcentaje de producción de riboflavina para 3 ensayos idealizados.

Así pues tenemos que de los 3 ensayos, la menor cantidad de biomasa se da en el ensayo 2, pero de manera inversa es en este ensayo donde se observa la

mayor producción de Riboflavina. Esto significa que al adicionar sacarosa al medio de producción, las vías metabólicas reaccionan de manera tal que favorece la conversión de sustrato en producto, dicho comportamiento puede observarse en la figura N° 114, en donde el ensayo 2 presenta los mayores valores de Yp/s.

TABLA N° 118: RESULTADOS DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO DE PRODUCTO SOBRE SUSTRATO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	Yp/s (g/g)	Yp/s (g/g)	Yp/s (g/g)
2,5	-	0,0362	0,0142
5	0,0036	0,0272	0,0114
7,5	-	0,0211	0,0077
10	0,0032	0,0137	0,0043
11,99	-	-	0,0012
12,5	-	0,0073	-
14,29	-	0,0024	-
15	0,0025	-	-
20	0,0019	-	-
25	0,0012	-	-
30	0,0008	-	-
33,31	0,0003	-	-

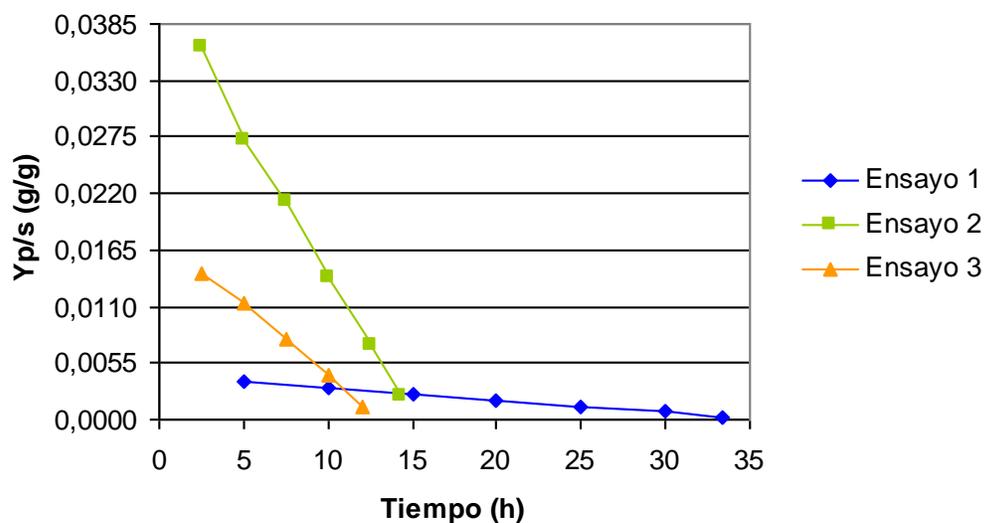


Figura N° 114: Gráfica de coeficiente de rendimiento de producto sobre sustrato Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Sin embargo, la formación de producto va disminuyendo a medida transcurre el proceso, lo cual puede observarse en la figura N° 115, en dicha figura se observa que las velocidades volumétricas de formación de producto van disminuyendo hasta interceptar el eje x, es en este punto donde se alcanzan las concentraciones máximas. Después de este punto las concentraciones riboflavina empiezan a disminuir, tal como se observa en la figura N° 116.

TABLA N° 119: RESULTADOS DE LA RAPIDEZ VOLUMETRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	QP (g/L.h)	QP (g/L.h)	QP (g/L.h)
2,5	-	3,67E-05	1,17E-05
5	5,07E-06	2,71E-05	8,36E-06
7,5	-	1,85E-05	5,19E-06
10	4,05E-06	1,09E-05	2,23E-06
12,5	-	4,26E-06	-5,43E-07
15	3,09E-06	-1,57E-06	-3,13E-06
17,5	-	-6,59E-06	-5,52E-06
20	2,18E-06	-1,09E-05	-
25	1,32E-06	-	-
30	5,08E-07	-	-
35	-2,50E-07	-	-
40	-9,58E-07	-	-
45	-1,61E-06	-	-

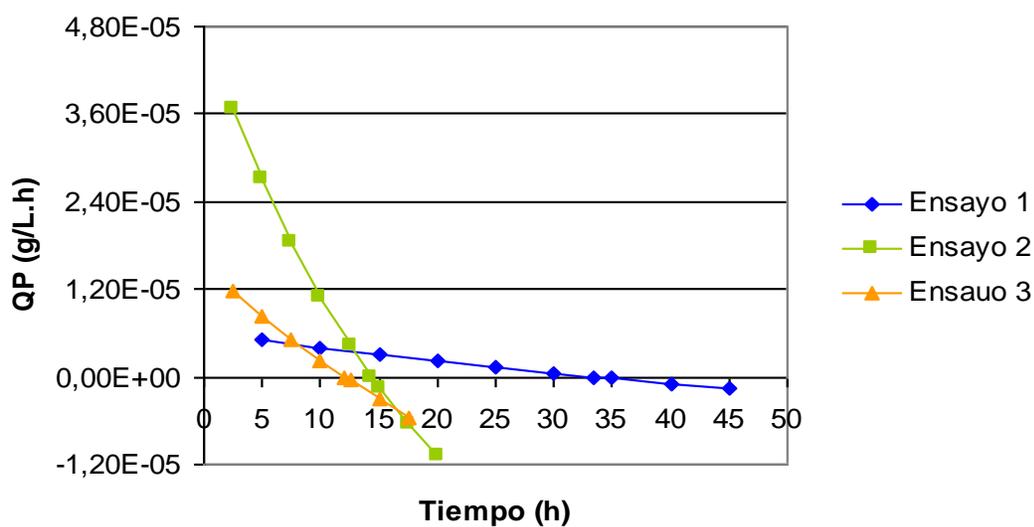


Figura N° 115: Gráfica de rapidez volumétrica de formación de producto Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

TABLA Nº 120: RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA A PARTIR DE LA IDEALIZACION DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	Conc. Riboflavina (g/L)	Conc. Riboflavina (g/L)	Conc. Riboflavina (g/L)
0	1,8500E-03	1,9200E-03	1,9400E-03
2,5	-	2,0249E-03	1,9737E-03
5	1,8780E-03	2,1045E-03	1,9988E-03
7,5	-	2,1613E-03	2,0157E-03
10	1,9007E-03	2,1980E-03	2,0249E-03
12,5	-	2,2168E-03	2,0270E-03
15	1,9186E-03	2,2200E-03	2,0224E-03
17,5	-	2,2096E-03	2,0115E-03
20	1,9317E-03	2,1877E-03	1,9949E-03
22,5	-	2,1559E-03	1,9730E-03
25	1,9404E-03	2,1161E-03	-
27,5	-	2,0698E-03	-
30	1,9450E-03	2,0185E-03	-
35	1,9456E-03	-	-
40	1,9426E-03	-	-
45	1,9361E-03	-	-

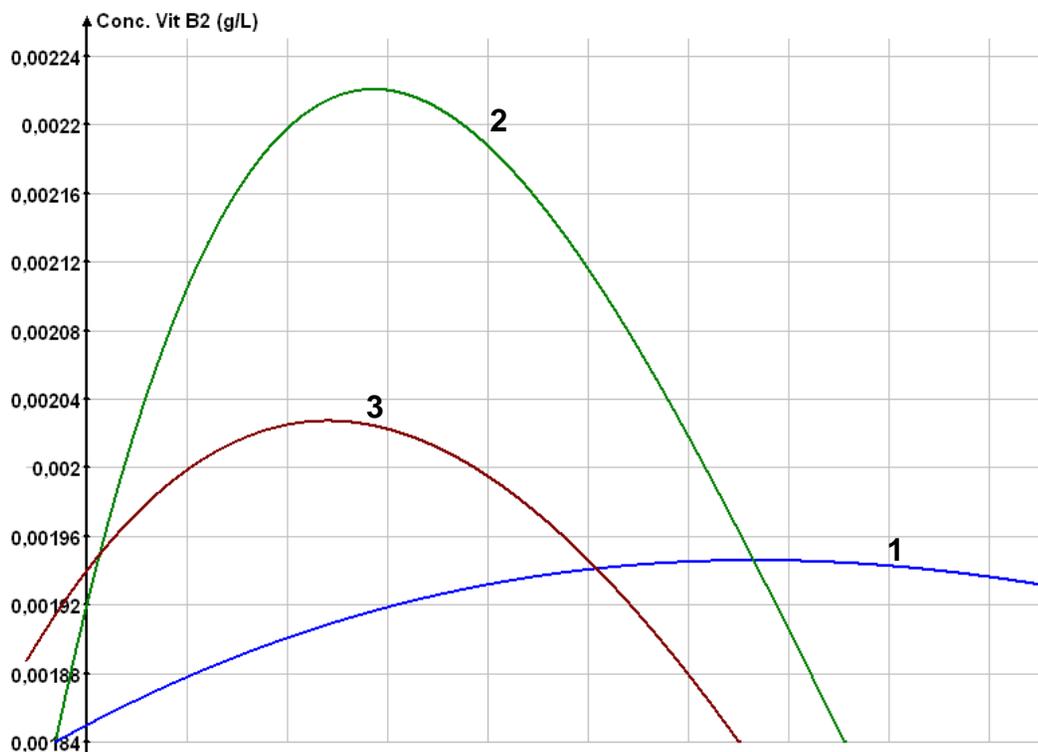


Figura Nº 116: Gráfica de concentración de Riboflavina Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

Curva 1: Corresponde a la gráfica idealizada "Conc. Riboflavina Vrs tiempo" del ensayo 1. (Cero – 45 horas).

Curva 2: Corresponde a la gráfica idealizada "Conc. Riboflavina Vrs tiempo" del ensayo 2. (Cero – 30 horas).

Curva 3: Corresponde a la gráfica idealizada "Conc. Riboflavina Vrs tiempo" del ensayo 3. (Cero – 22.5 horas).

La disminución en la concentración de riboflavina a partir del punto de máxima producción puede explicarse de la siguiente forma: durante el inicio de la fase de crecimiento, la levadura empieza a producir riboflavina como producto de su metabolismo, pero al adaptarse completamente al medio, comienza a aprovechar la riboflavina ya presente en el jugo de cáscara de piña, cesando de esta forma su producción, usando la Flavina mononucleótido (FMN) de la riboflavina presente, como cofactor enzimático de deshidrogenadas, las cuales son vitales en el ciclo TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de krebs) ya que este es alimentado por acetil – CoA, el cual se produce a partir del piruvato por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. El ciclo TCA es parte de las vías que dan origen a la biosíntesis de unidades monoméricas (aminoácidos, nucleótidos y otros) importantes para la construcción de material celular. ^(5, 8)

Dado que las máximas concentraciones de riboflavina se dan a inicios de la fase de crecimiento podemos identificar a la riboflavina como un metabolito tipo I o asociado al crecimiento (según clasificación de gaden). ⁽⁵⁾ Esto corresponde con lo observado en la figura N° 117, en donde la mayor formación de producto por gramo de biomasa (qp) se da a inicios de la fase de crecimiento.

TABLA Nº 121: RESULTADOS DE LA RAPIDEZ ESPECIFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTO A PARTIR DE LA IDEALIZACIÓN DE 3 ENSAYOS.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempo (h)	qp (g/g.h)	qp (g/g.h)	qp (g/g.h)
2,5	-	4,96E-04	1,67E-04
5	7,68E-05	3,11E-04	1,11E-04
7,5	-	1,80E-04	6,41E-05
10	5,63E-05	9,01E-05	2,53E-05
12,5	-	3,00E-05	-5,78E-06
15	3,81E-05	-9,52E-06	-3,10E-05
17,5	-	-3,47E-05	-5,02E-05
20	2,34E-05	-5,02E-05	-
25	1,19E-05	-	-
30	3,88E-06	-	-
35	-1,57E-06	-	-
40	-4,94E-06	-	-
45	-6,79E-06	-	-

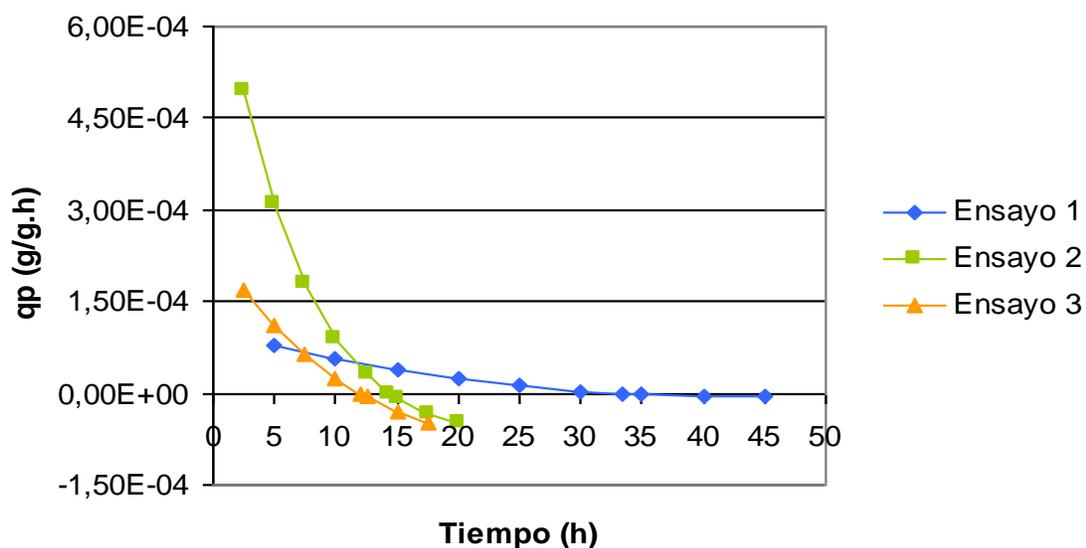


Figura Nº 117: Gráfica de rapidez específica de formación de producto Vrs tiempo. Comparación de 3 ensayos idealizados.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES.

1. La mayor producción de biomasa se obtiene a las 130.36 horas del ensayo 1 (sin aditivos), con una producción de 1.946 g/L equivalente a un aumento porcentual de biomasa de 96.81%. Sin embargo esto requiere un gran consumo de sustrato, en consecuencia solo una pequeña porción de este es destinado a la producción de riboflavina, disminuyendo así la eficacia de conversión de sustrato en producto (Y_p/s).
2. La eficacia de conversión de sustrato en biomasa (Y_x/s) se optimiza adicionando sulfato de amonio (5.0 g/L) y fosfato trisódico (0.2 g/L) al medio de producción (ensayo 3), ya que el nitrógeno y el fósforo potencian las vías anabólicas que dan lugar a la construcción de nuevo material celular, de manera tal que la mayor parte del sustrato consumido (azúcares totales) es destinado a la formación de biomasa, de esta forma tenemos que a las 108.23 horas del proceso se obtiene un máximo de 367.50g de biomasa generada por cada gramo de sustrato consumido.
3. La mayor producción de riboflavina se obtiene al adicionar sacarosa (1.0%) al medio de producción (ensayo 2), obteniéndose de esta forma una concentración máxima de 2.2206 mg/L equivalentes a un aumento porcentual del 13.54% a las 14.29 horas del proceso. Esto se debe a que al

haber más sustrato disponible, las vías metabólicas reaccionan de manera tal que favorecen la conversión de sustrato en producto, obteniéndose de esta forma mejores rendimientos.

4. Según lo observado a través del análisis de los parámetros de la cinética de crecimiento (generación de biomasa, consumo de sustrato, formación de producto), puede identificarse a la riboflavina como un metabolito tipo I o asociado al crecimiento (según clasificación de Gaden).
5. El pH del medio de producción observado en los 3 ensayos a lo largo del proceso fermentativo se mantiene dentro del intervalo óptimo requerido para el crecimiento de levaduras (3 – 6), lo cual hace innecesario el control del pH por medio de la adición de soluciones ácidas o básicas. Esto disminuye la probabilidad de contaminación del medio y reduce los costos del proceso.
6. La ***Candida utilis*** produce riboflavina como producto de su metabolismo durante las primeras horas del proceso, siendo los máximos observados de 1.9458 mg/L a las 33.31 horas, 2.2206 mg/L a las 14.29 horas y 2.0271 mg/L a las 11.99 horas para los ensayos 1, 2 y 3 respectivamente, pero al adaptarse completamente al medio, comienza a aprovechar la riboflavina ya presente en el jugo de cáscara de piña, cesando de esta forma su

producción, para comenzar a consumirla, utilizándola como cofactor de crecimiento.

7. La evaluación de las velocidades de formación de producto y de los coeficientes de rendimiento de producto sobre sustrato, indican que el proceso de producción de riboflavina es más eficaz en las primeras cinco horas del proceso.
8. El medio de fermentación preparado a partir de 2.60 Kg de cáscara de piña y 4.20 L de agua es adecuado para el crecimiento de la *Candida utilis*, ya que el jugo de cáscara de piña posee una gran cantidad de moléculas orgánicas y elementos esenciales para el crecimiento microbiano. Sin embargo no es adecuado para la producción de riboflavina, ya que esta forma parte de la composición natural del medio, evitando a la levadura el trabajo de sintetizarla a partir de glucosa y compuestos inorgánicos.
9. Los resultados obtenidos durante el proceso fermentativo, revelan un bajo rendimiento en la producción de riboflavina; los resultados no son lo suficientemente significativos como para considerar aplicaciones prácticas de este proceso.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES.

1. Utilizar un medio de producción en el cual la riboflavina (vitamina B₂) no forme parte de la composición del mismo, de manera que el microorganismo productor se vea forzado a sintetizar riboflavina como producto de sus procesos metabólicos y así obtener mejores rendimientos.
2. Utilizar otros microorganismos como el ***Eremothecium ashbyii*** o la ***Ashbya gossypii***, así como otros medios de producción (residuos agroindustriales) para evaluar y comparar la eficiencia de los métodos fermentativos en la producción de riboflavina, generando así alternativas para la aplicación de dichos métodos a escala industrial.
3. Emplear medios de cultivos definidos (simples) ya que poseen una composición química conocida y reproducible, permitiendo así un mejor control de las condiciones de crecimiento y producción.
4. Emplear el método de cultivo continuo, adicionando constantemente nueva fuente de carbono (azúcares) para de esta forma mantener constante la generación de biomasa con la consecuente producción de riboflavina.

5. Emplear el jugo de cáscara de piña como medio de cultivo para la generación de biomasa, ya que contiene una gran variedad de moléculas orgánicas (proteínas, vitaminas, azúcares, etc.) y elementos (potasio, calcio, fósforo, etc.) indispensables para la propagación de cepas microbianas. Debido a esto, su uso es ampliamente recomendable para la investigación biotecnológica.

6. Que la investigación y desarrollo de procesos de producción de riboflavina vayan acompañados de un estudio de la cinética de crecimiento microbiana y a partir de los datos experimentales se deben proponer modelos del comportamiento de los parámetros cinéticos a lo largo del proceso, ya que el modelado constituye una herramienta que permite describir, interpretar, predecir comportamientos y elaborar estrategias para la intervención en futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castellanos V. y otros. 2003. Producción de proteína unicelular, utilizando agua de cocimiento de maíz como medio de cultivo y estudio cinético del crecimiento de ***Candida utilis***. Trabajo de Graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. P. 23 – 62.
2. Céspedes A. 1986. Estudio de producción de vitamina B₁₂ por fermentación de desechos de la industrialización de la piña. Trabajo de Graduación. Maestría en Biotecnología. MX. Universidad Nacional Autónoma de México. P. 1 – 11.
3. CIES (Centro de Información Económica y Social), Ministerio de Economía. 2004 – 2005. Importaciones Acumuladas de Vitamina B₂ y sus derivados. San Salvador. SV.
4. Hernández R. 1998. Ensayos de obtención de vitamina B₂ por proceso de fermentación sumergida a partir del jugo de la cáscara de piña utilizando ***Saccharomyces Cerevisiae***. Trabajo de Graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. P. 10 – 13, 31 – 42.

5. Illianes A. 1996. Quinto curso latinoamericano de biotecnología. Chile. Escuela de ingeniería bioquímica. Universidad católica de Valparaíso. P. 14 – 18, 79 – 80, 86 – 87, 96 – 97.
6. Jagnow G. y otros. 1991. Biotecnología. Zaragoza. ES. Editorial Acribia S.A. P. 126 – 127, 130 – 133, 140 – 143, 168.
7. Manzur-ul-Haque H. 1973. Assay of vitamins in pharmaceutical preparations. John wiley and Sans. P. 99 – 116.
8. Scragg Alan. 1996. Biotecnología para ingenieros, Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México. Editorial Limusa S.A. de C.V. P. 46 – 54, 103 – 105, 184, 194 – 204, 222 – 223, 265.
9. The Society of Japanese Pharmacopoeia. 1971. The Pharmacopoeia of Japan. 8ª Edition. Part I. English Edition. Ministry of Health and Welfare. P. 666, 667.
10. Thomson. PLM. 2000. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Edición 31. si. Ediciones PLM S.A. de C.V. P. 120, 391.

11. Thomson. PLM. 2006. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Edición 36. América Central, Panamá y República Dominicana. P. 415, 486.

12. United States Pharmacopeial Convention Inc. 2002. The United States Pharmacopeia twenty-fifth revision and The National Formulary twentieth edition. Printed in Canada by Webcom Limited. Toronto. Ontario. P. 1527, 2340.

13. Aristizábal C. C 1997. Las Vitaminas (en línea). si. Consultado 20 de Septiembre de 2005. Disponible en: www.monografias.com/trabajos11/lasvitam/lasvitam.shtml

14. Asociación ágape de El Salvador. Hospital de recuperación nutricional (en línea). Consultado 26 de octubre de 2005. Disponible en: www.agape.com.sv/asocial/rnutricional.htm

15. Celedón E. C 1997. Modelos matemáticos (en línea). si. Consultado 11 de Septiembre de 2007. Disponible en: www.monografias.com/trabajos12/moma/moma.shtml

16. Cotignola M. I. y Otros. 1998. Utilización de simulaciones, integradas dentro de una estrategia didáctica específica (en línea). AR. Consultado 11 de Septiembre de 2007. Disponible en: ism.dei.uc.pt/ribie/docfiles/txt200342412629278.PDF
17. EUFIC (Consejo Europeo de Información sobre la alimentación), (en línea). si. Consultado 26 de octubre de 2005. Disponible en: www.eufic.org/sp/food/pag/food31/food312.htm
18. FAO (Food and Agriculture Organization). Levaduras y Mohos (en línea). si. Consultado 11 de enero de 2006. Disponible en: www.fao.org/ag/aqa/agap/frq/afri/espanol/document/tfeed8/data/493.htm
19. García C. C 2005. Modelado por medio de ecuaciones diferenciales (en línea). MX. Consultado 11 de Septiembre de 2007. Disponible en: www.itpuebla.edu.mx/alumnos/Cursos_Tutoriales/Carlos_Garcia_Franchi_ni/Modelado/Teoría/TeoriaED0100.htm
20. González S. CANAL-H C. Levaduras (en línea). si. Consultado 20 de septiembre de 2005. Disponible en: www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Micologia/LEVADURAS.appt.htm

21. Mateos F. 2003. Generalidades y Desarrollo histórico de la microbiología (en línea). ES. Consultado 26 de Octubre de 2005. Disponible en: www.coli.usal.es/web/educativo/micro2/tema01.html
22. Sánchez J. y Otros. 2001. Producción de Riboflavina por *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (en línea). Trabajo de graduación. Postgrado de Biotecnología de microorganismos. Mérida. VE. Universidad de los Andes. Consultado 26 de Octubre de 2005. Disponible en: www.saber.ula.ve/cgiwin/be_alex.exe?Acceso=T016300000545/2&Nombrebdb=Ssaber
23. Torres A. C 1997 – 2006. PMA: Desnutrición es muy alta (en línea). SV. Consultado 23 de enero de 2006. Disponible en : www.laprensa.com.sv/nacion/178736.asp
24. www.biopsicologia.net/fichas/page_1034.html. 2000-2003. Vitamina B2: riboflavina. Participación plástica y funcional (en línea). si. Consultado 20 de septiembre de 2005.
25. www.cimacnoticias.com/noticias/02oct/02102304.html. 2005. Alerta UNICEF, aumento alarmante de desnutrición infantil en El Salvador (en línea). USA. Consultado 26 de Octubre de 2005.

26. www.espectador.com/perspectiva/editoriales/edi0110091.htm. Editoriales (en línea). UR. Consultado 26 de Octubre de 2005.

27. www.geomundos.com/salud/espiritualidad/quieresprevenirenfermedades_doc_8173.html. C 2000 – 2005. Espiritualidad y Salud (en línea). ES. Consultado 26 de Octubre de 2005.

28. www.infomedica.com.ar/infomedica/numero31/vitaminab2.htm. Riboflavina (Vitamina B₂), (en línea). AR. Consultado 26 de Octubre de 2005.

29. www.librasdeamor.org/html/01_ladesnutricion/02_consecuencias.html. Libras de amor: Programa integral de nutrición (en línea). SV. Consultado 23 de enero de 2006.

ANEXOS

ANEXO N° 1

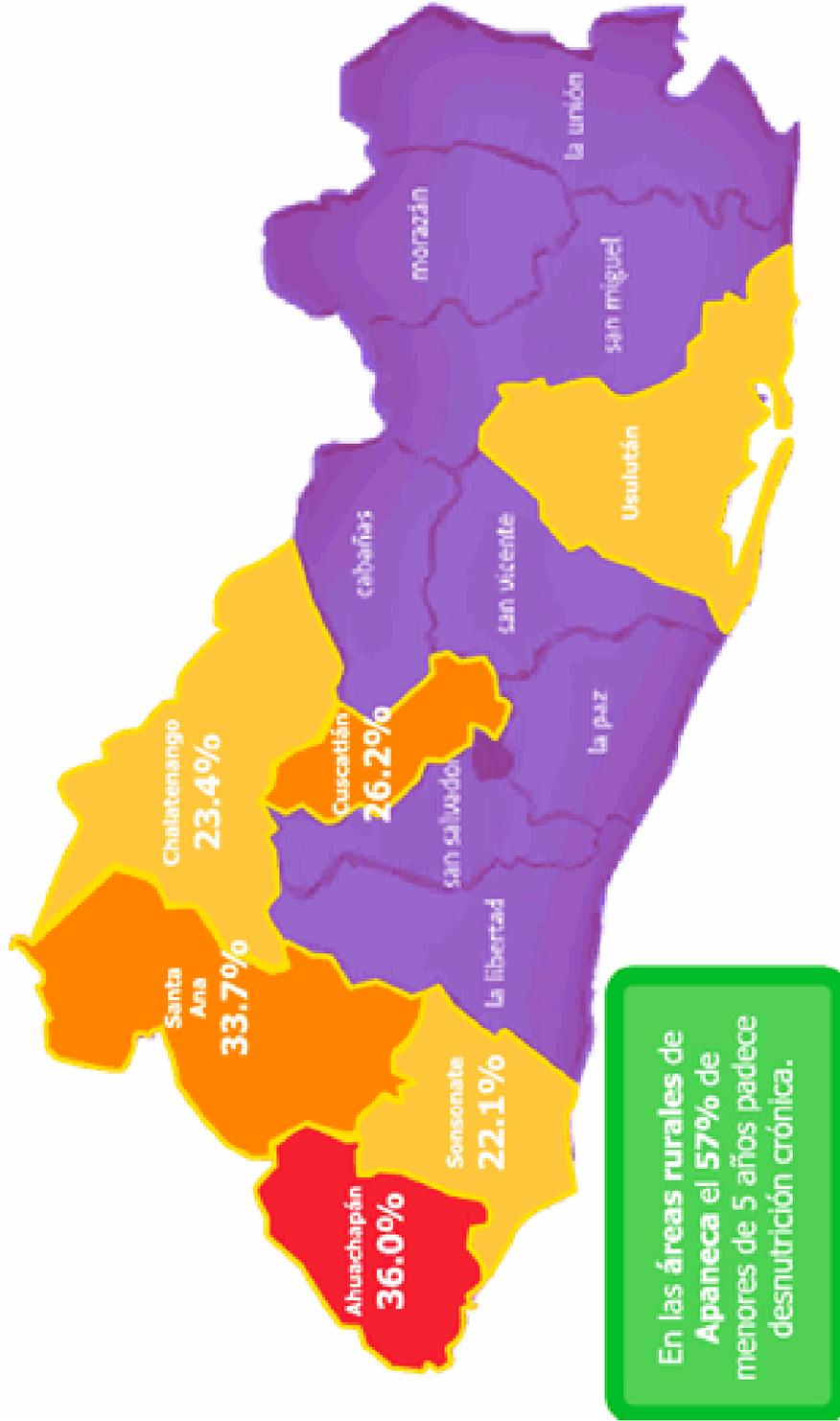


Figura N° 118: Mapa de El Salvador Mostrando los departamentos con mayor incidencia de desnutrición crónica en niños menores de 5 años.

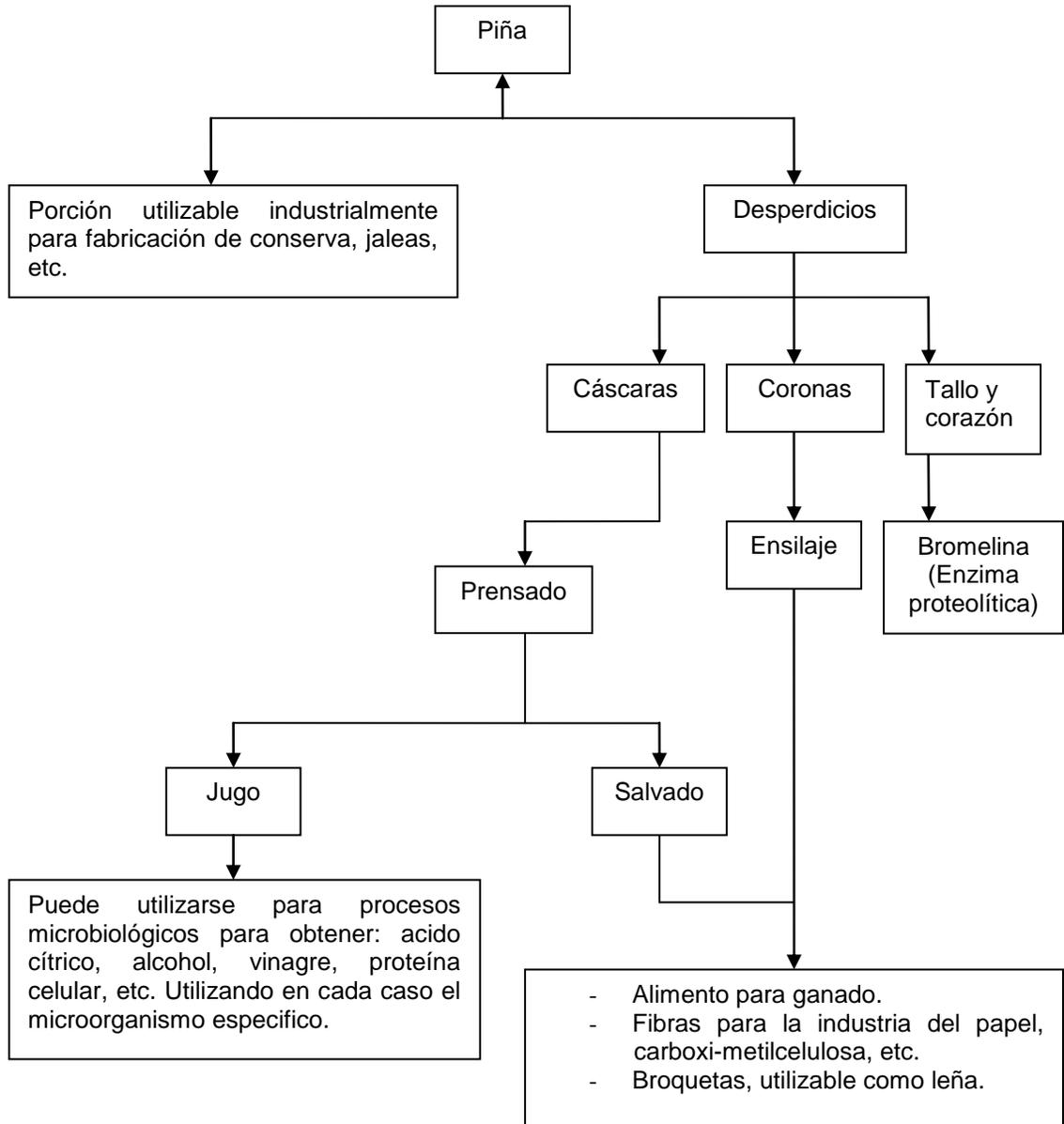
ANEXO N° 2



	Johnny	Glenda	Daniel
Edad (años)	11.3	9	5.8
Peso (kg)	28	21	19
Talla (cms)	120	117	112
Estado Desnutrición	severa	moderada	ninguna

Figura N° 119: Fotografía de niños con diferentes estados de desnutrición.

ANEXO Nº 3



Nota: Los hijuelos no aparecen en este esquema, ya que pueden conservarse para nuevas plantaciones.

Figura Nº 120: Esquema del aprovechamiento de la piña.

ANEXO Nº 4
ARCHIVO FOTOGRÁFICO



Figura Nº 121: Muestra de cáscara de piña.



Figura Nº 122: Recolección de cáscara de piña



Figura Nº 123: Procesamiento de la cáscara de piña.



Figura Nº 124: Filtrado en gasa.



Figura Nº 125: Morfología de las colonias de *Candida utilis*.

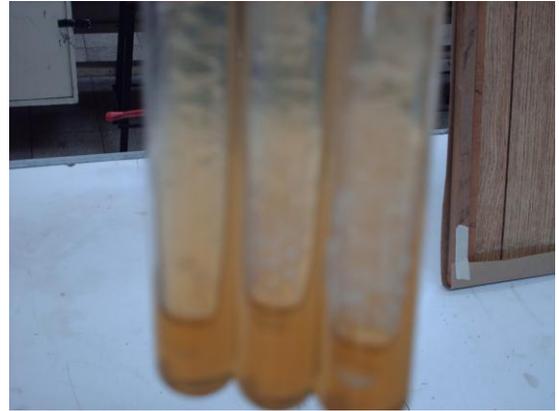


Figura Nº 126: *Candida utilis* en agar inclinado Sabouraud – Dextrosa.



Figura Nº 127: Incubación de inóculos.

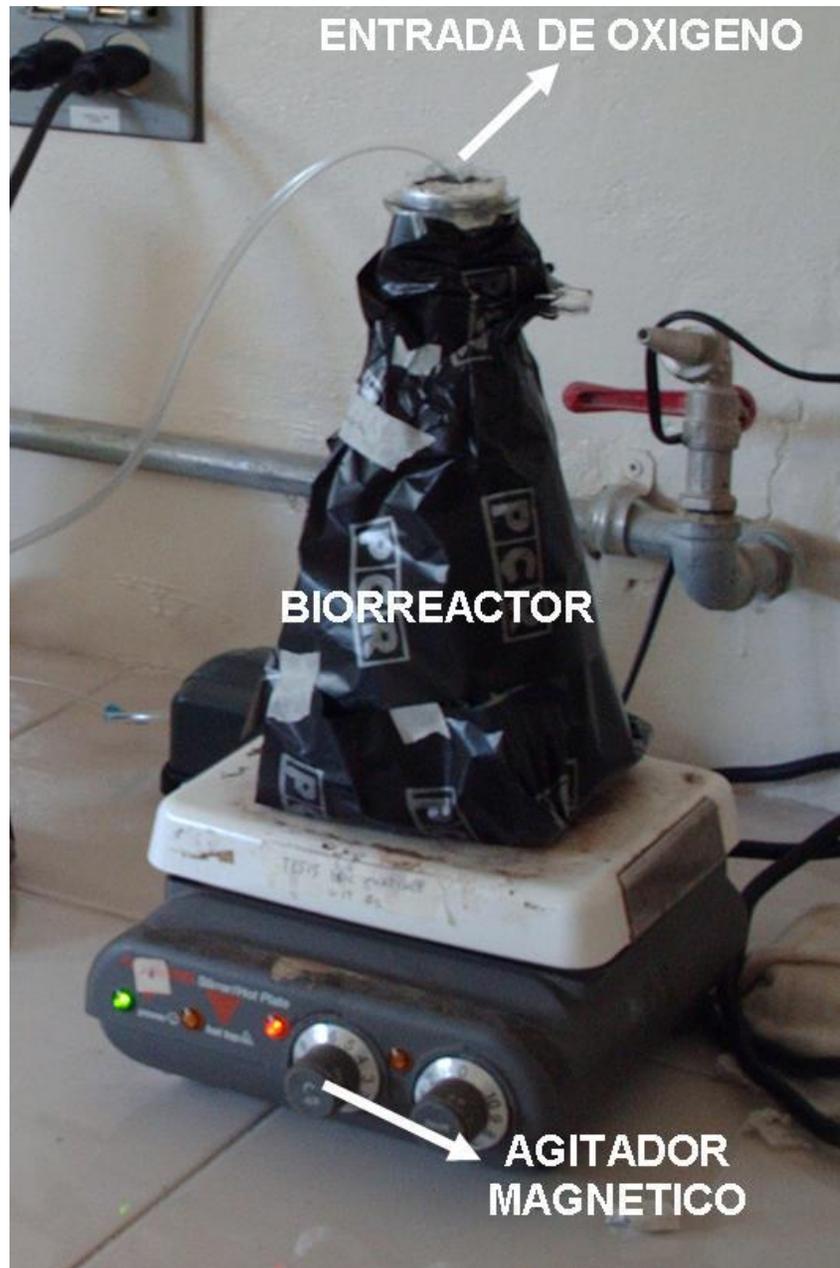


Figura N° 128: Biorreactor / Incubación.

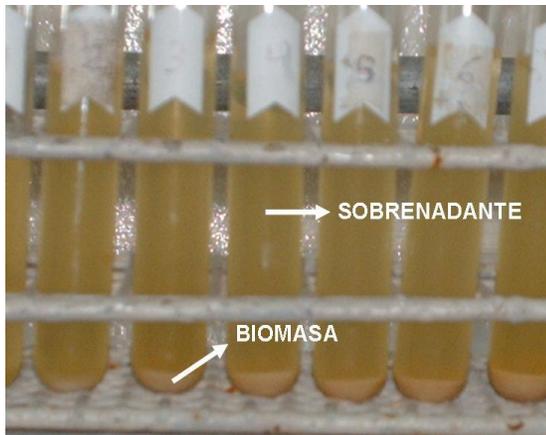


Figura N° 129: Tubos con biomasa sedimentada.

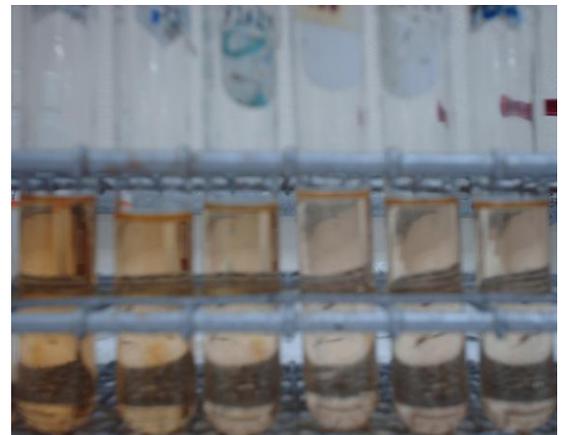


Figura N° 130: Determinación de azúcares totales.

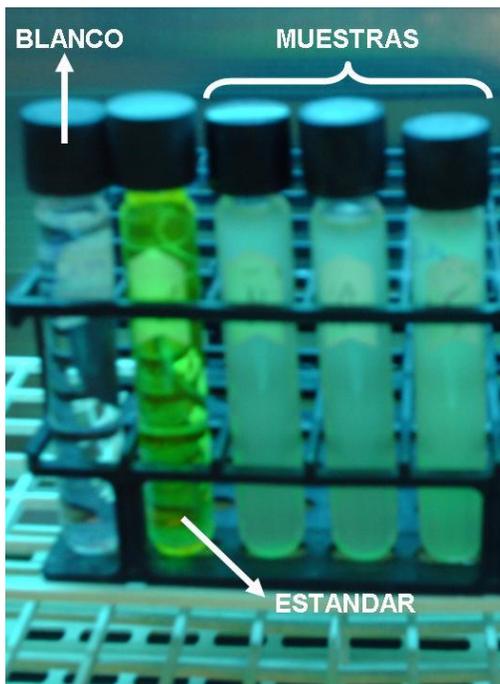


Figura N° 131: Identificación de riboflavina.



Figura N° 132: Muestra preparada para cuantificación de riboflavina (Límpida).

ANEXO Nº 5

OBTENCIÓN DEL JUGO DE CÁSCARA DE PIÑA

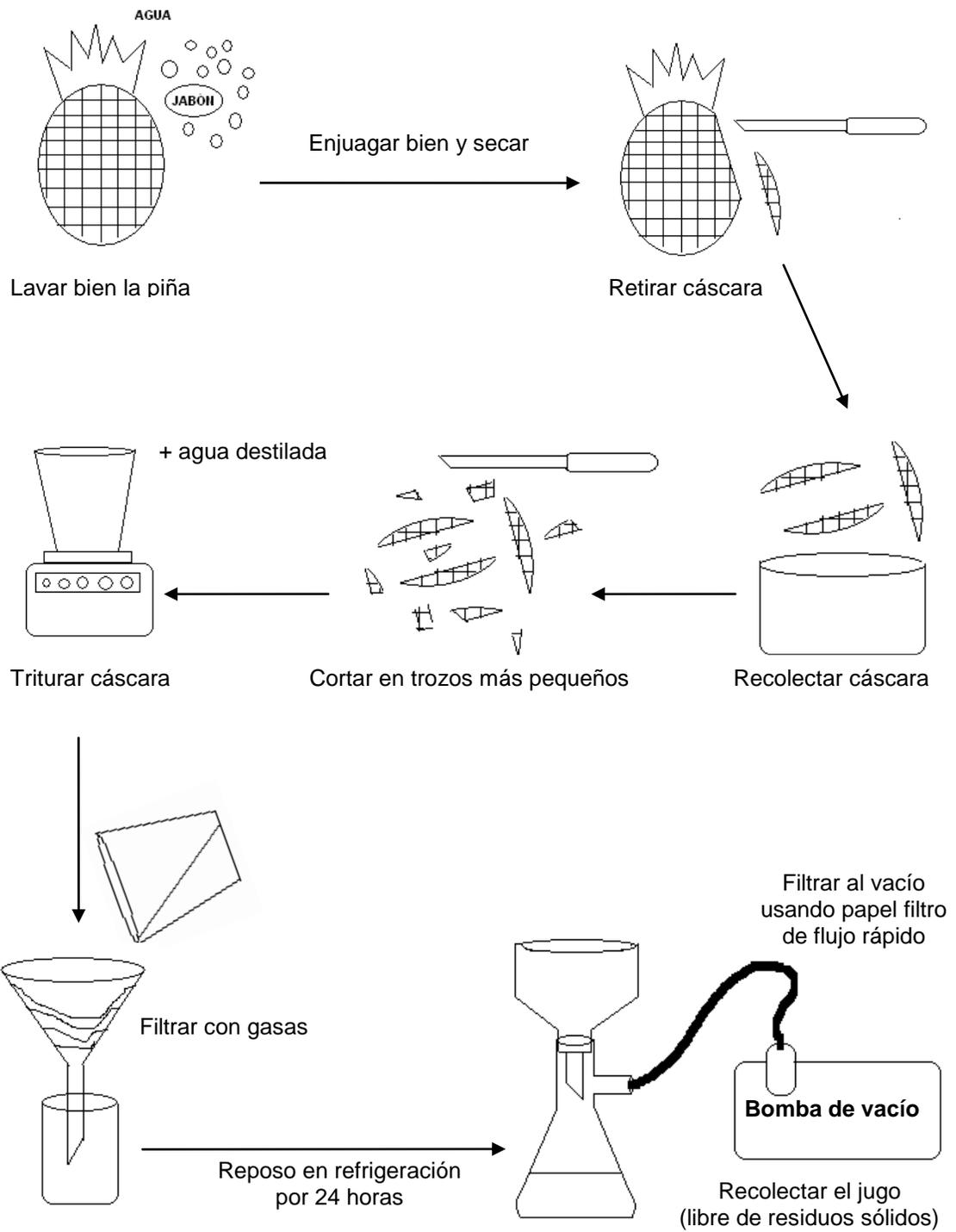


Figura N° 133: Procesamiento de la cáscara de piña.

TABLA N° 122: CANTIDADES DE CÁSCARA DE PIÑA Y AGUA NECESARIAS PARA OBTENER 4.96 L DE MEDIO DE PRODUCCIÓN.

CÁSCARA DE PIÑA	AGUA DESTILADA	DESPERDICIO	RENDIMIENTO
2.60 Kg	4.20 L	1.99 Kg	4.96 L

ANEXO N° 6

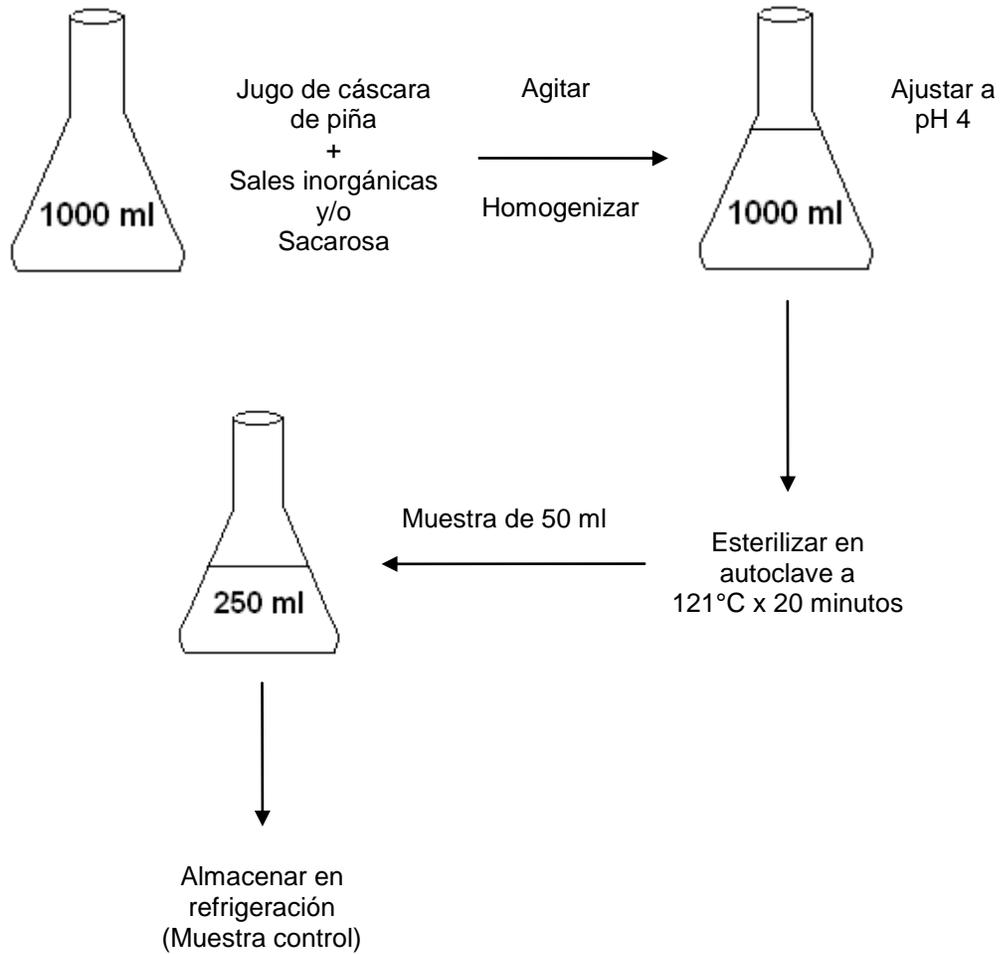


Figura N° 134: Preparación del medio de producción.

ANEXO Nº 7

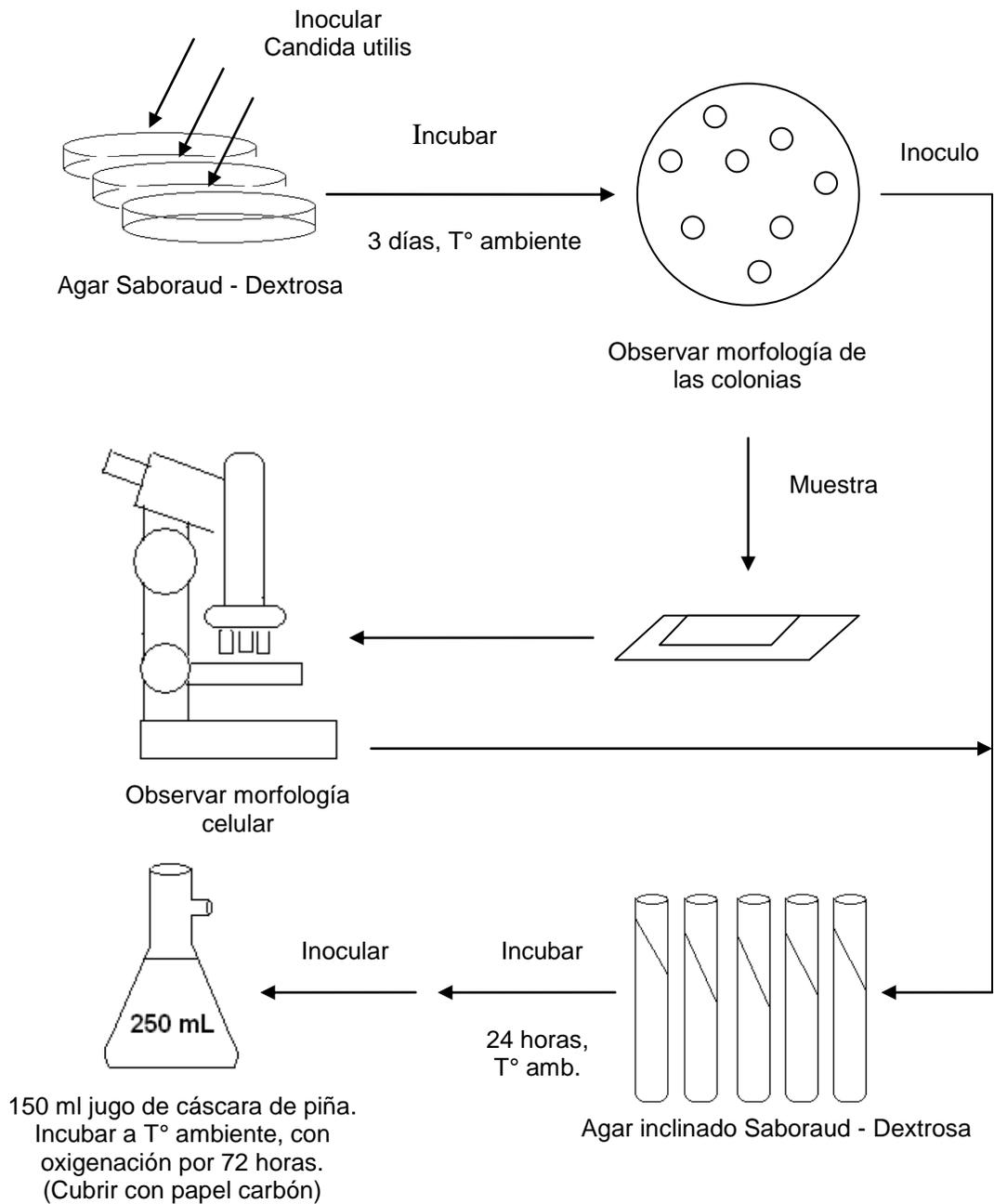


Figura Nº 135: Preparación del Inoculo.

ANEXO Nº 8

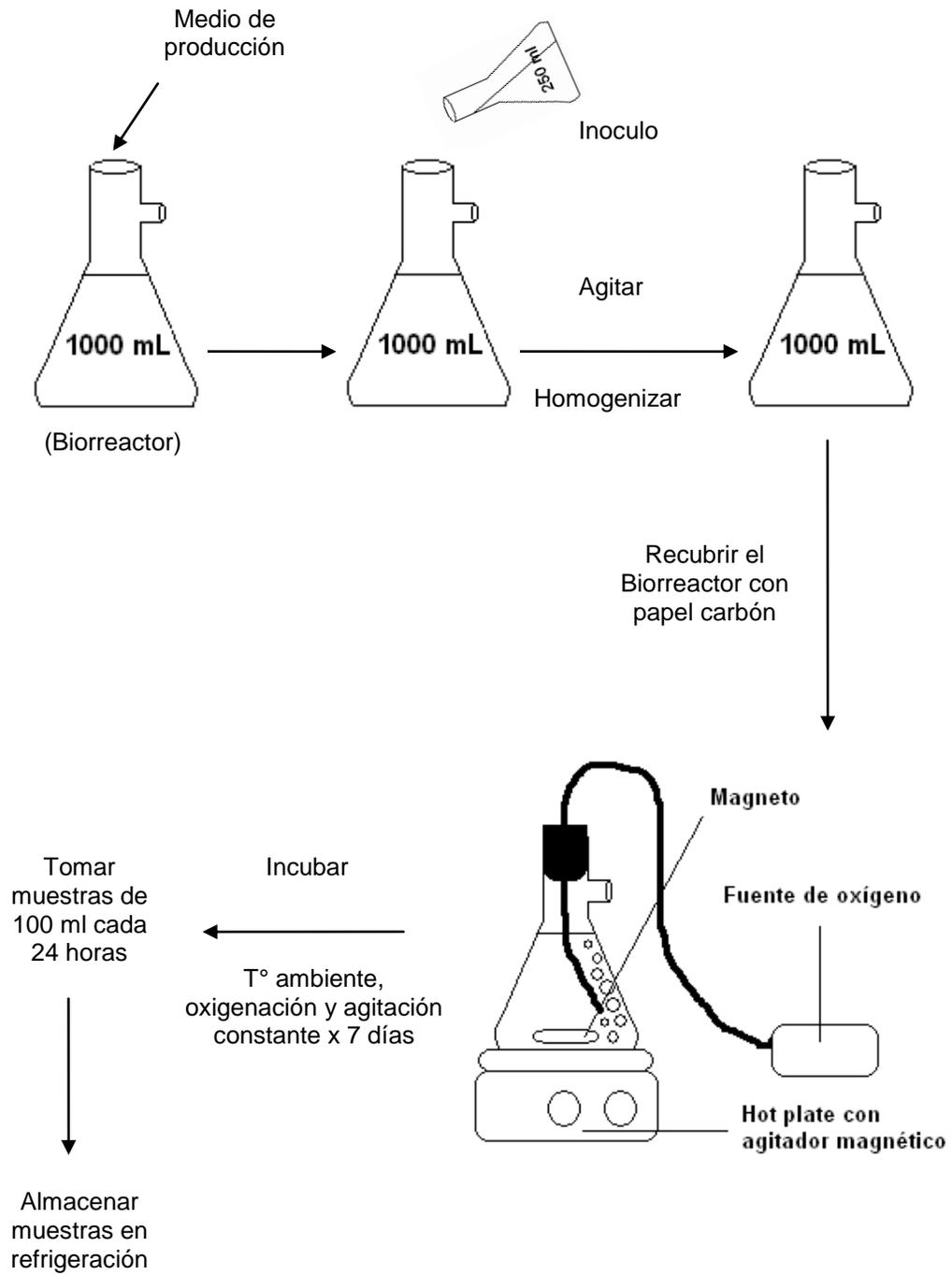


Figura Nº 136: Técnica de producción.

ANEXO N° 9

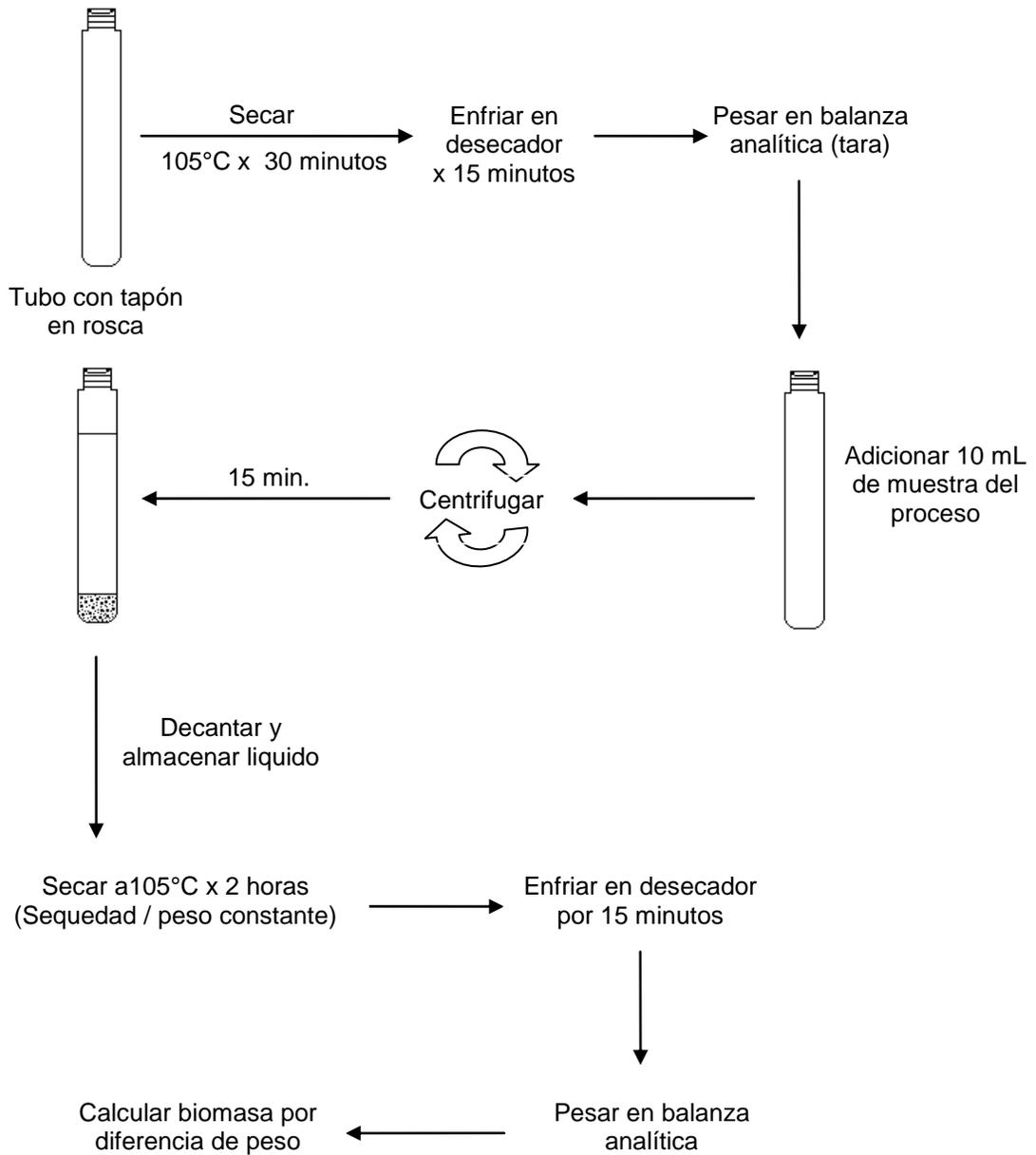


Figura N° 137: Determinación de biomasa por el método de peso seco.

ANEXO Nº 10

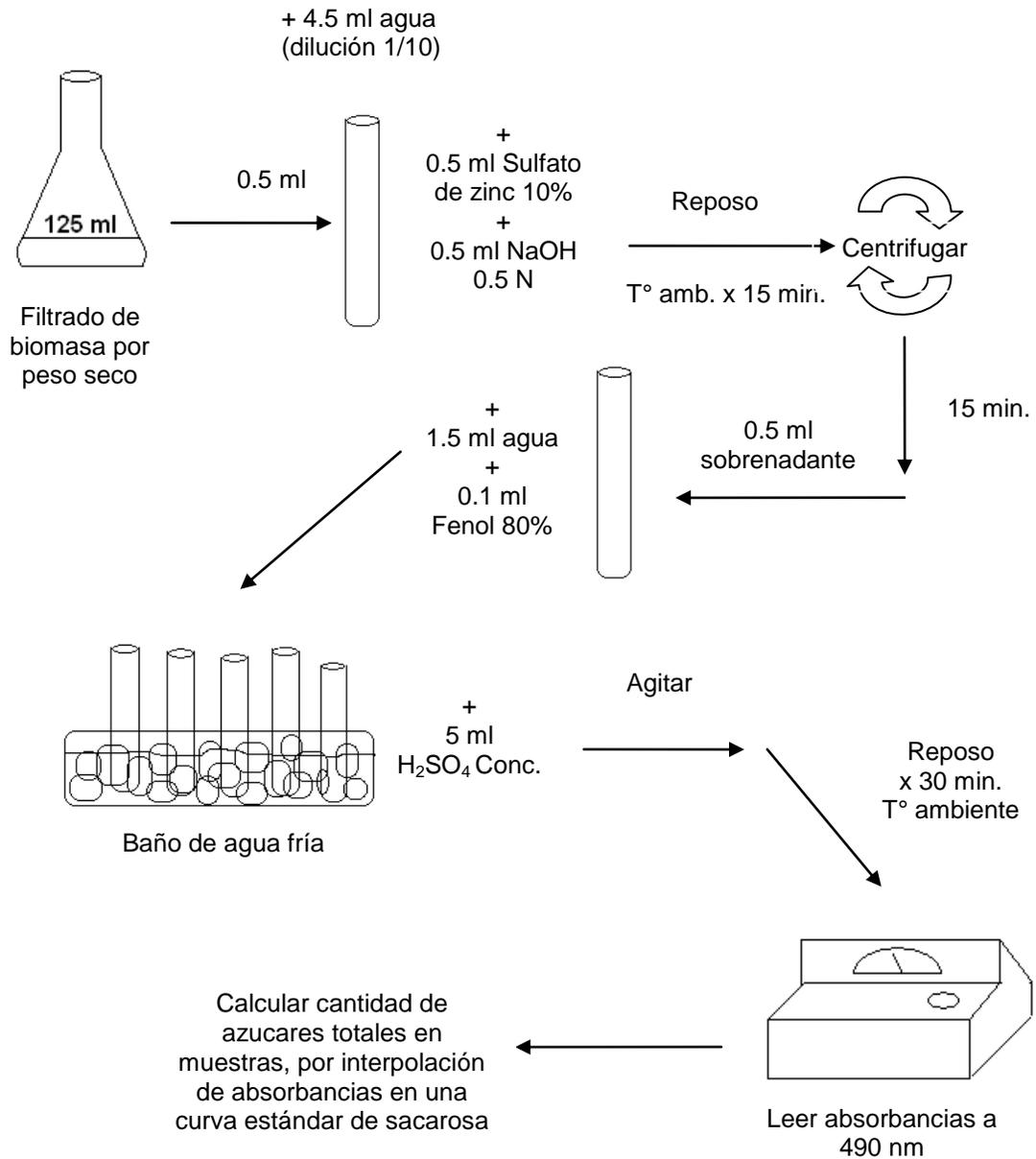


Figura Nº 138: Determinación de azúcares totales por el método de fenol – sulfúrico.

ANEXO Nº 11

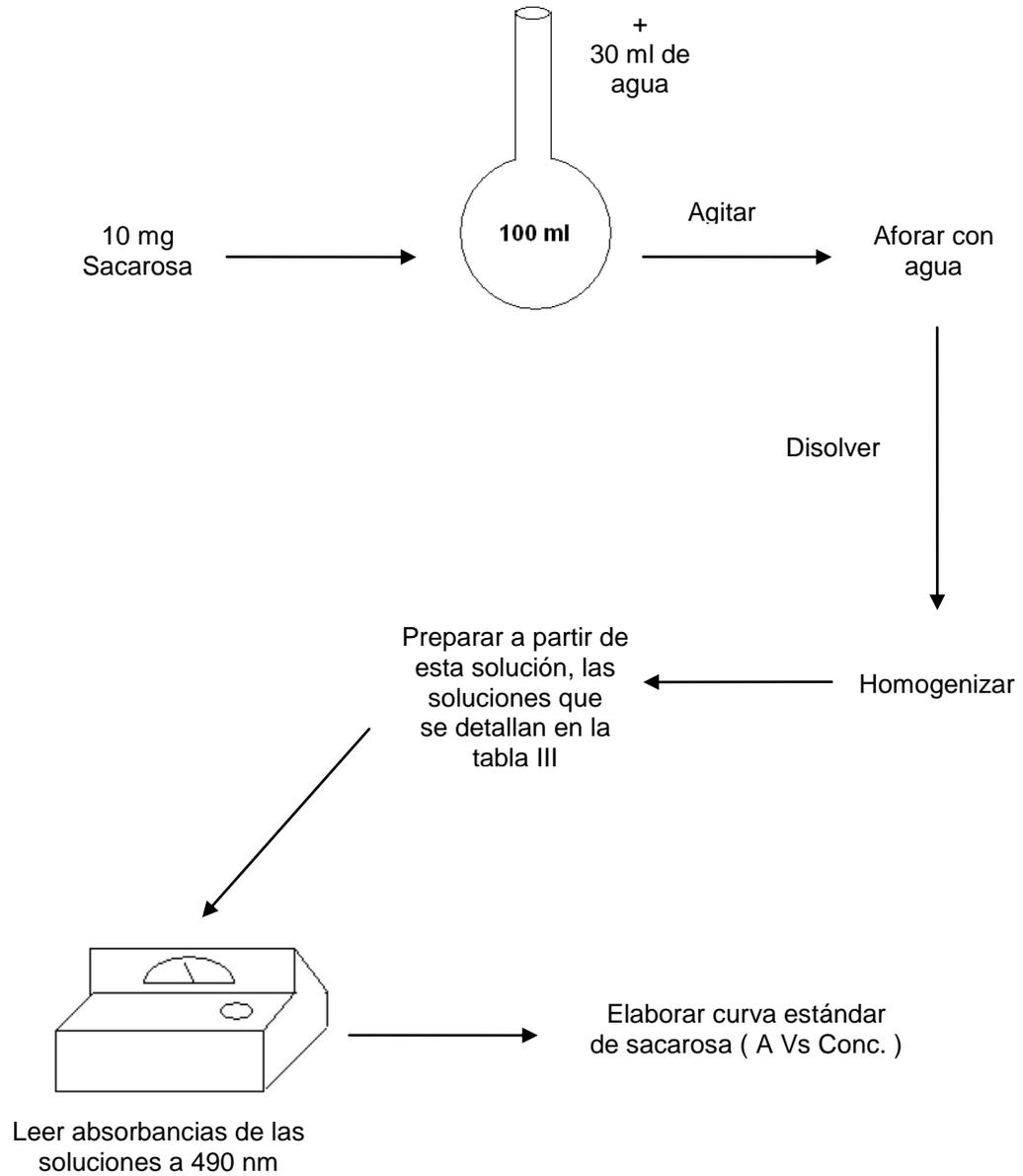


Figura Nº 139: Elaboración de la curva estándar de sacarosa.

ANEXO N° 12

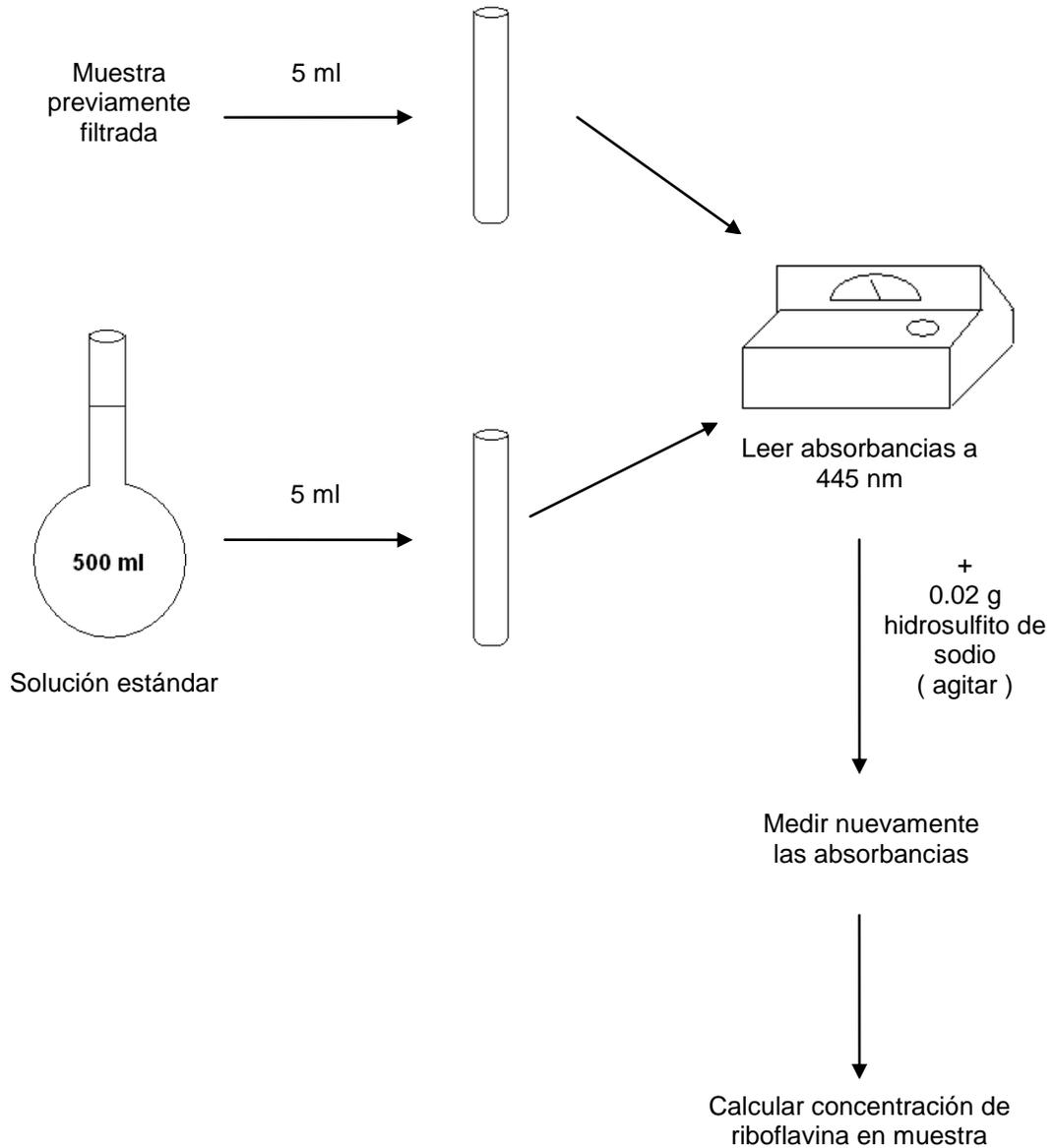


Figura N° 140: Determinación espectrofotométrica de riboflavina por el método del hidrosulfito de sodio.

TABLA N° 123: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL METODO DEL PESO SECO A LO LARGO DEL ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Peso de tubo en gramos (Pt)	Volumen de muestra en mL (Vmx)	Peso de tubo con muestra seca en gramos (Ptm)	Peso seco (g) Ps = Ptm - Pt	Promedio peso seco (g)	Biomasa (g/L) B = Ps/0.01L
inoculo	11,6730	10	11,6785	0,0055	0,0055	0,55
	11,1915	10	11,1975	0,0060		
	11,5230	10	11,5280	0,0050		
24	11,2265	10	11,2280	0,0015	0,0020	0,20
	11,4380	10	11,4405	0,0025		
	11,7220	10	11,7240	0,0020		
48	11,4735	10	11,4765	0,0030	0,0020	0,20
	11,6355	10	11,6370	0,0015		
	11,5060	10	11,5075	0,0015		
72	11,6720	10	11,6760	0,0040	0,0035	0,35
	11,4215	10	11,4245	0,0030		
	11,2760	10	11,2795	0,0035		
96	11,4570	10	11,4830	0,0260	0,0250	2,50
	11,1925	10	11,2190	0,0265		
	11,5240	10	11,5465	0,0225		
168	11,2275	10	11,2425	0,0150	0,0145	1,45
	11,4390	10	11,4520	0,0130		
	11,7215	10	11,7370	0,0155		
192	11,4745	10	11,4880	0,0135	0,0120	1,20
	11,6350	10	11,6465	0,0115		
	11,7230	10	11,7340	0,0110		
216	11,6710	10	11,6875	0,0165	0,0180	1,80
	11,6365	10	11,6555	0,0190		
	11,2750	10	11,2935	0,0185		

TABLA N° 124: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL METODO DEL PESO SECO A LO LARGO DEL ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Peso de tubo en gramos (Pt)	Volumen de muestra en mL (Vmx)	Peso de tubo con muestra seca en gramos (Ptm)	Peso seco (g) Ps = Ptm - Pt	Promedio peso seco (g)	Biomasa (g/L) B = Ps/0.01L
inoculo	11,5825	10	11,5840	0,0015	0,0030	0,30
	11,4095	10	11,4135	0,0040		
	11,5350	10	11,5385	0,0035		
24	11,4450	10	11,4470	0,0020	0,0035	0,35
	11,4500	10	11,4540	0,0040		
	11,6305	10	11,6350	0,0045		
48	11,4855	10	11,4960	0,0105	0,0095	0,95
	11,5450	10	11,5535	0,0085		
	11,5685	10	11,5780	0,0095		
72	11,5810	10	11,5880	0,0070	0,0080	0,80
	11,4835	10	11,4925	0,0090		
	11,4940	10	11,5020	0,0080		
96	11,5190	10	11,5300	0,0110	0,0125	1,25
	11,4090	10	11,4220	0,0130		
	11,5360	10	11,5495	0,0135		
168	11,4445	10	11,4590	0,0145	0,0135	1,35
	11,4510	10	11,4645	0,0135		
	11,6300	10	11,6425	0,0125		
192	11,4870	10	11,4980	0,0110	0,0105	1,05
	11,5445	10	11,5550	0,0105		
	11,6320	10	11,6420	0,0100		
216	11,5805	10	11,5925	0,0120	0,0110	1,10
	11,5465	10	11,5580	0,0115		
	11,4940	10	11,5035	0,0095		

TABLA N° 125: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL METODO DEL PESO SECO A LO LARGO DEL ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Peso de tubo en gramos (Pt)	Volumen de muestra en mL (Vmx)	Peso de tubo con muestra seca en gramos (Ptm)	Peso seco (g) Ps = Ptm - Pt	Promedio peso seco (g)	Biomasa (g/L) B = Ps/0.01L
inoculo	11,5010	10	11,5085	0,0075	0,0065	0,65
	11,3550	10	11,3600	0,0050		
	11,4835	10	11,4905	0,0070		
24	11,3905	10	11,3920	0,0015	0,0010	0,10
	11,3990	10	11,3995	0,0005		
	11,5560	10	11,5570	0,0010		
48	11,4345	10	11,4415	0,0070	0,0065	0,65
	11,4705	10	11,4780	0,0075		
	11,4675	10	11,4725	0,0050		
72	11,5065	10	11,5110	0,0045	0,0050	0,50
	11,3830	10	11,3890	0,0060		
	11,4540	10	11,4585	0,0045		
96	11,4185	10	11,4215	0,0030	0,0035	0,35
	11,3695	10	11,3735	0,0040		
	11,4920	10	11,4955	0,0035		
168	11,4050	10	11,4185	0,0135	0,0150	1,50
	11,4075	10	11,4230	0,0155		
	11,5735	10	11,5895	0,0160		
192	11,4430	10	11,4585	0,0155	0,0145	1,45
	11,4880	10	11,5025	0,0145		
	11,5505	10	11,5640	0,0135		
216	11,5240	10	11,5475	0,0235	0,0230	2,30
	11,4650	10	11,4880	0,0230		
	11,4395	10	11,4620	0,0225		

ANEXO N° 16

TABLA Nº 126: CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA EN BIORREACTOR, SEGÚN LAS CONCENTRACIONES DE INOCULO OBTENIDAS.

	C1	V1	V2	C2 = C1.V1/V2
Ensayo 1	0,55	150	950	0,09
Ensayo 2	0,30	150	950	0,05
Ensayo 3	0,65	150	950	0,10

Donde:

C1: Concentración de biomasa en inóculo (g/L).

V1: Volumen de inóculo (mL).

C2: Concentración de biomasa en Biorreactor (g/L).

V2: Volumen total de jugo de cáscara de piña e inóculo en biorreactor (g/L)

TABLA Nº 127: DILUCION DE INOCULO, DE MANERA QUE AL ADICIONAR 150 ML DE INÓCULO AL BIORREACTOR, SE OBTENGA UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE 0.05 G/L.

	C1	C2	V1	V2 = C1.V1/C2
Ensayo 1	0,55	0,30	150	275
Ensayo 2	0,30	0,30	150	150
Ensayo 3	0,65	0,30	150	325

Donde:

C1: Concentración inicial de biomasa en inóculo (g/L).

V1: Volumen inicial de inóculo (mL).

C2: Concentración final de biomasa en inóculo (g/L).

V2: Volumen final de inóculo (mL).

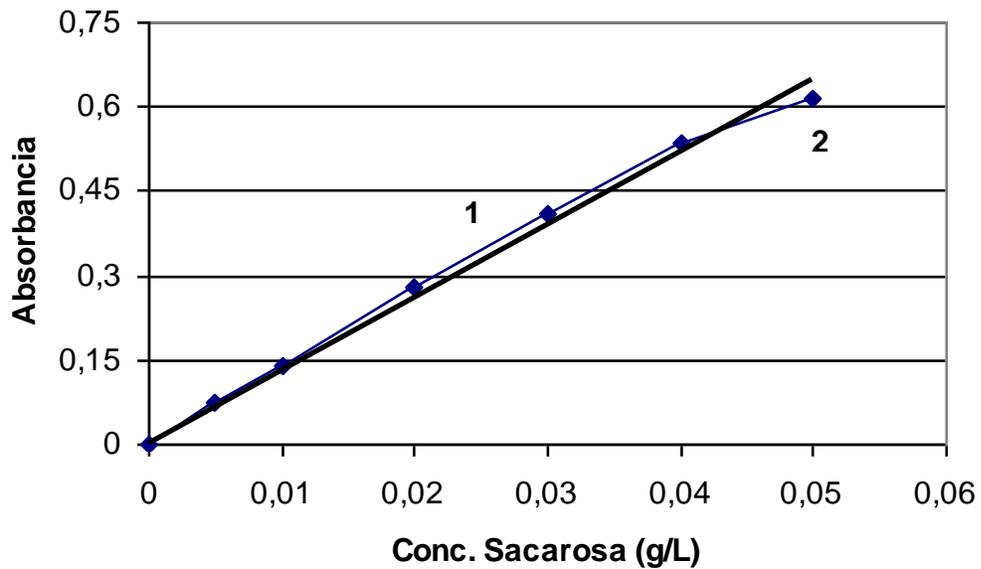
ANEXO Nº 17

TABLA Nº 128: RESULTADOS POR TRIPLICADO EN LA ELABORACION DE LA CURVA ESTANDAR DE SACAROSA.

Tubo	ml de Sln. estándar	µg de estándar	Volumen final de estándar (mL)	Conc. de estándar (g/L)	Absorbancia	Promedio
1	0,0	0	2,0	0,000	0,000	0,000
1	0,0	0	2,0	0,000	0,000	
1	0,0	0	2,0	0,000	0,000	
2	0,1	10	2,0	0,005	0,075	0,075
2	0,1	10	2,0	0,005	0,074	
2	0,1	10	2,0	0,005	0,075	
3	0,2	20	2,0	0,010	0,139	0,139
3	0,2	20	2,0	0,010	0,139	
3	0,2	20	2,0	0,010	0,138	
4	0,4	40	2,0	0,020	0,279	0,279
4	0,4	40	2,0	0,020	0,279	
4	0,4	40	2,0	0,020	0,279	
5	0,6	60	2,0	0,030	0,409	0,408
5	0,6	60	2,0	0,030	0,408	
5	0,6	60	2,0	0,030	0,408	
6	0,8	80	2,0	0,040	0,534	0,534
6	0,8	80	2,0	0,040	0,534	
6	0,8	80	2,0	0,040	0,533	
7	1,0	100	2,0	0,050	0,615	0,614
7	1,0	100	2,0	0,050	0,613	
7	1,0	100	2,0	0,050	0,614	

ANEXO Nº 18

CURVA ESTANDAR DE SACAROSA: ABSORBANCIA VRS CONCENTRACIÓN DE SACAROSA



Curva 1: Curva estándar de sacarosa.

Curva 2: Regresión lineal de curva estándar (curva idealizada).

La curva estándar idealizada se representa por la ecuación: $Y = 12.967X$, en donde "Y" es la absorbancia de la muestra, y "X" es la concentración de sustrato (azúcares totales) en gramos por litro. Entonces tenemos que conociendo la absorbancia de una muestra de concentración de sustrato desconocida, podemos calcular la concentración de dicha muestra por despeje de la ecuación antes mencionada, de manera que: $X = Y / 12.967$

ANEXO Nº 19

TABLA Nº 129: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL - SULFÚRICO A LO LARGO DEL ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Absorbancia	$X = Y / 12.967$	Factor de dilución (FD)	X x FD	Conc. promedio (g/L)
0	0,113	0,0087	40	0,3486	0,3486
	0,113	0,0087	40	0,3486	
	0,113	0,0087	40	0,3486	
24	0,086	0,0066	40	0,2653	0,2653
	0,087	0,0067	40	0,2684	
	0,085	0,0066	40	0,2622	
48	0,091	0,0070	40	0,2807	0,2807
	0,090	0,0069	40	0,2776	
	0,092	0,0071	40	0,2838	
72	0,084	0,0065	40	0,2591	0,2591
	0,082	0,0063	40	0,2529	
	0,086	0,0066	40	0,2653	
96	0,076	0,0059	40	0,2344	0,2375
	0,077	0,0059	40	0,2375	
	0,078	0,0060	40	0,2406	
168	0,066	0,0051	40	0,2036	0,2036
	0,065	0,0050	40	0,2005	
	0,067	0,0052	40	0,2067	
192	0,074	0,0057	40	0,2283	0,2283
	0,074	0,0057	40	0,2283	
	0,074	0,0057	40	0,2283	
216	0,075	0,0058	40	0,2314	0,2314
	0,077	0,0059	40	0,2375	
	0,073	0,0056	40	0,2252	

ANEXO Nº 20

TABLA Nº 130: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL – SULFÚRICO A LO LARGO DEL ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Absorbancia	$X = Y / 12.967$	Factor de dilución (FD)	X x FD	Conc. promedio (g/L)
0	0,116	0,0089	40	0,3578	0,3547
	0,111	0,0086	40	0,3424	
	0,118	0,0091	40	0,3640	
24	0,066	0,0051	40	0,2036	0,2036
	0,064	0,0049	40	0,1974	
	0,068	0,0052	40	0,2098	
48	0,106	0,0082	40	0,3270	0,3270
	0,100	0,0077	40	0,3085	
	0,112	0,0086	40	0,3455	
72	0,089	0,0069	40	0,2745	0,2745
	0,090	0,0069	40	0,2776	
	0,088	0,0068	40	0,2715	
96	0,086	0,0066	40	0,2653	0,2653
	0,087	0,0067	40	0,2684	
	0,085	0,0066	40	0,2622	
168	0,071	0,0055	40	0,2190	0,2190
	0,073	0,0056	40	0,2252	
	0,069	0,0053	40	0,2128	
192	0,074	0,0057	40	0,2283	0,2499
	0,078	0,0060	40	0,2406	
	0,091	0,0070	40	0,2807	
216	0,072	0,0056	40	0,2221	0,2221
	0,073	0,0056	40	0,2252	
	0,071	0,0055	40	0,2190	

ANEXO Nº 21

TABLA Nº 131: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL - SULFÚRICO A LO LARGO DEL ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Absorbancia	$X = Y / 12.967$	Factor de dilución (FD)	X x FD	Conc. promedio (g/L)
0	0,117	0,0090	40	0,3609	0,3609
	0,117	0,0090	40	0,3609	
	0,117	0,0090	40	0,3609	
24	0,105	0,0081	40	0,3239	0,3332
	0,112	0,0086	40	0,3455	
	0,107	0,0083	40	0,3301	
48	0,107	0,0083	40	0,3301	0,3270
	0,106	0,0082	40	0,3270	
	0,105	0,0081	40	0,3239	
72	0,104	0,0080	40	0,3208	0,3208
	0,104	0,0080	40	0,3208	
	0,104	0,0080	40	0,3208	
96	0,101	0,0078	40	0,3116	0,3146
	0,102	0,0079	40	0,3146	
	0,103	0,0079	40	0,3177	
168	0,103	0,0079	40	0,3177	0,3208
	0,104	0,0080	40	0,3208	
	0,105	0,0081	40	0,3239	
192	0,103	0,0079	40	0,3177	0,3208
	0,107	0,0083	40	0,3301	
	0,102	0,0079	40	0,3146	
216	0,106	0,0082	40	0,3270	0,3270
	0,106	0,0082	40	0,3270	
	0,106	0,0082	40	0,3270	

ANEXO Nº 22

TABLA Nº 132: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO A LO LARGO DEL ENSAYO 1.

Tiempo (h)	Amx	Amx'	A St	A St'	Conc. Std (µg/ml)	Conc. Vit. B2 (µg/ml)*	Conc. promedio (µg/ml)	Conc. Vit. B2 (g/L)
0	0,570	0,502	0,642	0,096	15	1,87	1,87	0,00187
	0,570	0,501	0,642	0,096	15	1,90		
	0,570	0,503	0,642	0,096	15	1,84		
24	0,515	0,441	0,659	0,099	15	1,98	1,96	0,00196
	0,513	0,439	0,659	0,099	15	1,98		
	0,515	0,443	0,659	0,099	15	1,93		
48	0,452	0,386	0,659	0,099	15	1,77	1,77	0,00177
	0,451	0,385	0,659	0,099	15	1,77		
	0,452	0,386	0,659	0,099	15	1,77		
72	0,377	0,304	0,653	0,094	15	1,96	1,96	0,00196
	0,377	0,304	0,653	0,094	15	1,96		
	0,378	0,305	0,653	0,094	15	1,96		
96	0,446	0,381	0,653	0,094	15	1,74	1,77	0,00177
	0,445	0,378	0,653	0,094	15	1,80		
	0,445	0,379	0,653	0,094	15	1,77		
168	0,434	0,384	0,659	0,096	15	1,33	1,36	0,00136
	0,434	0,383	0,659	0,096	15	1,36		
	0,436	0,384	0,659	0,096	15	1,39		
192	0,365	0,313	0,659	0,096	15	1,39	1,41	0,00141
	0,366	0,313	0,659	0,096	15	1,41		
	0,364	0,310	0,659	0,096	15	1,44		
216	0,392	0,335	0,661	0,098	15	1,52	1,52	0,00152
	0,390	0,334	0,661	0,098	15	1,49		
	0,392	0,334	0,661	0,098	15	1,55		

* Ver formula utilizada en capitulo 4, página 114.

ANEXO Nº 23

TABLA Nº 133: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO A LO LARGO DEL ENSAYO 2.

Tiempo (h)	Amx	Amx'	A St	A St'	Conc. Std (µg/ml)	Conc. Vit. B2 (µg/ml)*	Conc. promedio (µg/ml)	Conc. Vit. B2 (g/L)
0	0,458	0,388	0,642	0,096	15	1,92	1,92	0,00192
	0,458	0,387	0,642	0,096	15	1,95		
	0,458	0,389	0,642	0,096	15	1,90		
24	0,478	0,399	0,659	0,099	15	2,12	2,12	0,00212
	0,477	0,398	0,659	0,099	15	2,12		
	0,478	0,399	0,659	0,099	15	2,12		
48	0,436	0,375	0,659	0,099	15	1,63	1,63	0,00163
	0,435	0,373	0,659	0,099	15	1,66		
	0,435	0,375	0,659	0,099	15	1,61		
72	0,377	0,331	0,653	0,094	15	1,23	1,23	0,00123
	0,379	0,333	0,653	0,094	15	1,23		
	0,378	0,333	0,653	0,094	15	1,21		
96	0,400	0,348	0,653	0,094	15	1,40	1,40	0,00140
	0,402	0,349	0,653	0,094	15	1,42		
	0,400	0,349	0,653	0,094	15	1,37		
168	0,414	0,351	0,659	0,096	15	1,68	1,65	0,00165
	0,414	0,353	0,659	0,096	15	1,63		
	0,414	0,352	0,659	0,096	15	1,65		
192	0,368	0,320	0,659	0,096	15	1,28	1,28	0,00128
	0,370	0,322	0,659	0,096	15	1,28		
	0,368	0,320	0,659	0,096	15	1,28		
216	0,345	0,286	0,661	0,098	15	1,57	1,60	0,00160
	0,346	0,286	0,661	0,098	15	1,60		
	0,346	0,285	0,661	0,098	15	1,63		

* Ver formula utilizada en capitulo 4, página 114.

ANEXO Nº 24

TABLA Nº 134: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA CUANTIFICACION DE RIBOFLAVINA POR EL METODO DEL HIDROSULFITO DE SODIO A LO LARGO DEL ENSAYO 3.

Tiempo (h)	Amx	Amx'	A St	A St'	Conc. Std (µg/ml)	Conc. Vit. B2 (µg/ml)*	Conc. promedio (µg/ml)	Conc. Vit. B2 (g/L)
0	0,491	0,422	0,642	0,096	15	1,90	1,92	0,00192
	0,491	0,421	0,642	0,096	15	1,92		
	0,490	0,419	0,642	0,096	15	1,95		
24	0,433	0,356	0,659	0,099	15	2,06	2,06	0,00206
	0,430	0,353	0,659	0,099	15	2,06		
	0,433	0,356	0,659	0,099	15	2,06		
48	0,478	0,429	0,659	0,099	15	1,31	1,34	0,00134
	0,479	0,429	0,659	0,099	15	1,34		
	0,479	0,428	0,659	0,099	15	1,37		
72	0,526	0,481	0,653	0,094	15	1,21	1,18	0,00118
	0,528	0,485	0,653	0,094	15	1,15		
	0,525	0,481	0,653	0,094	15	1,18		
96	0,673	0,653	0,653	0,094	15	0,54	0,54	0,00054
	0,673	0,651	0,653	0,094	15	0,59		
	0,673	0,655	0,653	0,094	15	0,48		
168	0,686	0,659	0,659	0,096	15	0,72	0,72	0,00072
	0,687	0,659	0,659	0,096	15	0,75		
	0,687	0,661	0,659	0,096	15	0,69		
192	0,559	0,519	0,659	0,096	15	1,07	1,07	0,00107
	0,558	0,517	0,659	0,096	15	1,09		
	0,559	0,520	0,659	0,096	15	1,04		
216	0,554	0,515	0,661	0,098	15	1,04	1,07	0,00107
	0,553	0,513	0,661	0,098	15	1,07		
	0,553	0,512	0,661	0,098	15	1,09		

* Ver formula utilizada en capitulo 4, página 114.

ANEXO Nº 25

TABLA Nº 135: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA MEDICION DE PH A LO LARGO DEL ENSAYO 1.

Tiempo (h)	pH	Promedio
0	4,00	4,01
0	4,01	
0	4,01	
24	3,63	3,63
24	3,63	
24	3,63	
48	4,17	4,17
48	4,16	
48	4,17	
72	3,72	3,73
72	3,73	
72	3,73	
96	4,66	4,66
96	4,67	
96	4,65	
168	4,48	4,49
168	4,51	
168	4,47	
192	4,35	4,35
192	4,32	
192	4,37	
216	3,81	3,81
216	3,82	
216	3,81	

ANEXO Nº 26

TABLA Nº 136: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA MEDICION DE PH A LO LARGO DEL ENSAYO 2.

Tiempo (h)	pH	Promedio
0	3,95	3,93
0	3,91	
0	3,94	
24	4,12	4,12
24	4,12	
24	4,13	
48	3,39	3,38
48	3,38	
48	3,36	
72	3,26	3,27
72	3,29	
72	3,26	
96	3,45	3,48
96	3,49	
96	3,49	
168	3,37	3,37
168	3,37	
168	3,37	
192	3,62	3,61
192	3,61	
192	3,61	
216	3,57	3,57
216	3,58	
216	3,56	

ANEXO Nº 27

TABLA Nº 137: RESULTADOS POR TRIPLICADO DE LA MEDICION DE PH A LO LARGO DEL ENSAYO 3.

Tiempo (h)	pH	Promedio
0	4,12	4,14
0	4,17	
0	4,13	
24	3,52	3,53
24	3,53	
24	3,53	
48	3,58	3,58
48	3,58	
48	3,58	
72	3,71	3,70
72	3,69	
72	3,71	
96	3,83	3,86
96	3,86	
96	3,88	
168	3,25	3,26
168	3,26	
168	3,26	
192	3,10	3,10
192	3,10	
192	3,10	
216	3,15	3,14
216	3,12	
216	3,15	

ANEXO N° 28
MATERIAL Y EQUIPO

Material.

- Probetas: 10 mL, 25 mL, 100 mL, 250 mL.
- Beakers: 100 mL, 250 mL, 500 mL.
- Matraz Erlenmeyers: 250 mL, 500 mL.
- Balones volumétricos: 100 mL, 500 mL.
- kitazato: 250 mL, 1000 mL
- Pipetas volumétricas: 1.0 mL, 5.0 mL.
- Pipetas de Mohr: 1.0 mL, 2.0 mL, 10.0 mL.
- Agitadores de vidrio.
- Cajas de petri.
- Asas de inoculación.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca.
- Desecador.
- Embudos de vidrio.
- Porta objetos.
- Mechero de Bunsen.
- Recipientes plásticos.
- Cuchillo.
- Papel filtro.
- Papel toalla.
- Papel carbón.
- Gasas.
- Colador casero.
- Tirro.

Equipo.

- Microscopio.
- Centrifugadora.
- Espectrofotómetro:
Espectronic 20-D.
- Lámpara de luz ultravioleta.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Incubadora.
- Refrigerador.
- Estufa.
- Hot plate.
- Agitador magnético.
- Fuente de oxígeno para
pecera.
- Licuadora.
- Cocina eléctrica.
- Bomba de vacío.

ANEXO Nº 29

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Reactivos.

- Agua destilada.
- Agua libre de dióxido de carbono.
- Alcohol isopropílico.
- Sulfato de Zinc 10%.
- Acido sulfúrico concentrado.
- Fenol 80%.
- Acido clorhídrico 1N.
- Hidróxido de sodio 1N.
- Hidróxido de sodio 0.5N.
- Acido acético glacial diluido (1:400).
- Fosfato trisódico.
- Sulfato de amonio.
- Sacarosa.
- Estándar de trabajo de riboflavina.
- Hidrosulfito de sodio

Medios de cultivo.

- Agar Saboraud – Dextrosa.
- Jugo de cáscara de piña.

ANEXO Nº 30
PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- FENOL 80% (100 ml).

Medir 80 ml de Fenol GR e incorporar a un balón volumétrico de 100 ml, aforar con agua destilada y homogenizar.

- SULFATO DE ZINC 10% (100 ml).

Pesar en una balanza analítica o semi-analítica 10 g de sulfato de zinc e incorporar a un beaker de 100 ml, Adicionar 50 ml de agua destilada y agitar con un agitador de vidrio hasta completa disolución, de ser necesario adicionar 25 ml más de agua destilada. Incorporar la solución a un balón volumétrico de 100 ml. Lavar el beaker con dos porciones de 10 ml de agua destilada y adicionar los lavados al balón volumétrico. Aforar con agua destilada y homogenizar.

- HIDROXIDO DE SODIO 0.5 N (100 ml).

Pesar 2.0 g de hidróxido de sodio e incorporar a un beaker de 150 ml con 50 ml de agua libre de dióxido de carbono y agitar con un agitador de vidrio hasta completa disolución, de ser necesario adicionar 25 ml mas de agua libre de dióxido de carbono. Incorporar la solución a un balón volumétrico de 100 ml.

Lavar el beaker de con dos porciones de 10 ml de agua libre de dióxido de carbono y adicionar los lavados al balón volumétrico. Aforar con agua libre de dióxido de carbono y homogenizar.

- HIDROXIDO DE SODIO 1 N (100 ml).

Pesar 4.0 g de hidróxido de sodio e incorporar a un beaker de 150 ml con 50 ml de agua libre de dióxido de carbono y agitar con un agitador de vidrio hasta completa disolución, de ser necesario adicionar 25 ml mas de agua libre de dióxido de carbono. Incorporar la solución a un balón volumétrico de 100 ml. Lavar el beaker de con dos porciones de 10 ml de agua libre de dióxido de carbono y adicionar los lavados al balón volumétrico. Aforar con agua libre de dióxido de carbono y homogenizar.

- ACIDO CLORHIDRICO 1 N (100 ML).

Medir 80 ml de agua destilada e incorporar a un balón volumétrico de 100 ml, adicionar 8.5 ml de ácido clorhídrico concentrado, agitar hasta completa disolución, aforar con agua destilada y homogenizar.

- ACIDO ACETICO GLACIAL DILUIDO 1:400 (1000 ml)

Medir 997.5 ml de agua destilada e incorporar a un balón volumétrico de 1000 ml, adicionar 2.5 ml de acido acético glacial y homogenizar.

ANEXO Nº 31

PREPARACIÓN DE AGAR SABOURAUD – DEXTROSA

AGAR DEXTROSA SABOURAUD (Difco).

Suspender 65 g en 1000 ml de agua destilada, calentar a ebullición hasta completa disolución y distribuir sobre cajas de petri en la forma deseada. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C). No recalentar para evitar el ablandamiento del medio. pH final: 5.6 ± 0.2 a 25 °C.

NOTA: Dependiendo del fabricante el método de preparación puede variar, por lo que en general se recomienda seguir las instrucciones del fabricante.

ANEXO Nº 32

TABLA Nº 138: IMPORTACIONES ACUMULADAS DE VITAMINA B₂ Y SUS DERIVADOS. EL SALVADOR, ENERO - DICIEMBRE 2004.

PAIS DE ORIGEN	CANTIDAD	
	DOLARES	KILOGRAMOS
ESTADOS UNIDOS	1,600	28
MEXICO	714	50
GUATEMALA	849	4
HONDURAS	2,310	123
ALEMANIA OCC.	9,382	320
ESPAÑA	775	50
FRANCIA	7,150	550
ITALIA	4,650	93
SUIZA	19,431	493
INDIA	1,103	-
CHINA CONTINENTAL	1,108	26
TOTAL:	49,072	1,737

FUENTE: Centro de Información Económica y Social (CIES), Ministerio de Economía.

ANEXO Nº 33

TABLA Nº 139: IMPORTACIONES ACUMULADAS DE VITAMINA B₂ Y SUS DERIVADOS. EL SALVADOR, ENERO - OCTUBRE 2005.

PAIS DE ORIGEN	CANTIDAD	
	DOLARES	KILOGRAMOS
ESTADOS UNIDOS	547	5
GUATEMALA	3,597	85
HONDURAS	4,602	230
COLOMBIA	5	-
CHILE	2	-
ALEMANIA OCC.	2,340	310
ESPAÑA	1,163	75
ITALIA	5,500	104
INGLATERRA	2,280	50
SUIZA	25,502	539
TOTAL:	45,538	1,398

FUENTE: Centro de Información Económica y Social (CIES), Ministerio de Economía.

TABLA Nº 140: ALGUNOS MEDICAMENTOS DISPONIBLES EN EL MERCADO QUE CONTIENEN RIBOFLAVINA

NOMBRE	FORMA FARMACEUTICA	CONCENTRACION DE RIBOFLAVINA	OTROS COMPONENTES	INDICACION	PRECIO
CENTRUM	Tabletas	1.7 mg	Vitaminas A, B ₁₂ , B ₆ , C, D, E. Acido fólico, Biotina, Acido pantotenico, Calcio, Hierro, Fósforo, Yodo, Magnesio, Zinc, Selenio, Niacinamida, Cobre, Manganeseo, Cromo, Potasio, Níquel, Estaño, Vanadio, Luteína.	Indicado para la deficiencia de los componentes de la formula.	\$ 12.93
BILOKAN COMPLEX	Capsulas	1.0 micg	Ginseng, Extracto de ginkgobiloba, Biotina, Pantotenato de calcio, B – caroteno, Fumarato ferroso, Cobre, Potasio, Manganeseo, Molibdeno, Zinc, Fosfato tricalcico, Fósforo, Vitaminas: B ₁ , B ₆ , B ₁₂ , C, E.	Indicado en la disminución de capacidades físicas e intelectuales, hábitos alimenticios inadecuados, convalecencia, estrés psíquico, fatiga y vértigo de origen vascular.	\$ 8.64
BIO - SENG	Tabletas	2 mg	Panax ginseng, Deanol bitartrato, Hematoporfirina, Nicotinamida, Pantotenato de calcio, Hierro aminoquelado, Ac. Fólico, Fósforo, Fluor, Cobre, Potasio, Calcio, Manganeseo, Zinc, Magnesio, Cromo, Selenio, Colina, Meso inositol, Vitaminas: A, C, E, B ₁ , B ₆ , B ₁₂ , D ₃ .	En general como tratamiento coadyuvante de una nutrición deficiente en vitaminas y sales minerales en personas que han estado sometidas a dietas de adelgazamiento o bien por convalecencia retrasada después de enfermedades, cirugías o accidentes.	\$ 12.87
FORMANCE	Polvo	0.528 mg	Proteína derivada de leche descremada de vaca, Sólidos de jarabe de maíz, Sacarosa, Aceite de cartamo, Aceite de soya, Aceite de canola, Sodio, potasio, Cloruro, Calcio, Fósforo, Magnesio, Hierro, Cobre, Zinc, Yodo, Manganeseo, Beta – caroteno, Niacina, Biotina.	Durante el embarazo cubre las necesidades de nutrientes extras que requieren la madre y el bebé en desarrollo. Optimiza la nutrición de la madre después del parto.	\$ 5.59

