



FONDO FIDUCIARIO PEREZ-GUERRERO PARA LA COOPERACION TECNICA Y ECONOMICA ENTRE PAISES EN VIAS DE DESARROLLO

PROYECTO DE COOPERACIÓN SUR-SUR



Instituto Politécnico Nacional 
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA - CCB
LABORATORIO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS
Núcleo de Engenharia Metabólica (NEM)



“Levaduras de destilería: Criterios de calidad para la producción de etanol y alimento animal”

INFORME FINAL

Entidad Ejecutora:

**Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de
Azúcar (ICIDCA)**

Contrapartes Extranjeras:

- **Universidad Federal de Pernambuco (UFPE, Brasil).**
- **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).**

Diciembre, 2018

ÍNDICE

I.	CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO	1
II.	INFORME TÉCNICO	2
II.1.	Actividad 01.	4
II.2.	Actividad 02.	10
II.3.	Actividad 03.	26
II.4.	Actividad 04.	50
III.	LECCIONES APRENDIDAS	53
IV.	INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE	54

I. CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.

1. Líneas de Acción.

Alimento animal. Seguridad Alimentaria. Medio ambiente y energía para el Desarrollo Económico Sostenible.

2. Entidad local cubana responsable.

Nombre y Dirección: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca No. 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón, CP 11000, La Habana.

Nombre del responsable y sus funciones:
Ing. Gustavo Saura Laria, Coordinador General del Proyecto

3. Objetivo General.

Contribuir al desarrollo y aplicación de procedimientos microbiológicos para el control de la calidad microbiológica del proceso fermentativo en destilerías de alcohol y fábricas de levadura forrajera a partir de vinazas, que permitan la selección adecuada de cepas productoras de etanol, control de contaminantes y bioprospección de cepas *Saccharomyces* con potencial probiótico para alimentación animal.

4. Objetivo Específico

1. Estandarizar una metodología para la identificación polifásica de levaduras contaminantes de destilería. .
2. Crear una base de datos referencial de levaduras contaminantes en destilerías como ecosistema.
3. Disponer de cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con desempeño fermentativo "personalizado".
4. Estandarizar una metodología para la prospección de levaduras de destilería *Saccharomyces cerevisiae* con perfil probiótico.
5. Formar recursos humanos calificados en los países involucrados (personal científico y/o tecnólogos) en métodos de caracterización polifásica de levaduras de destilería.
6. Realizar un Encuentro Científico-Técnico sobre control microbiológico en biotecnologías a partir de derivados de la caña de azúcar.

5.	Presupuesto inicial	<u>32.000.00 USD</u>
	Presupuesto ejecutado (cierre 20 /12/2018)	28 800.00 USD

6. Temporalización

Fecha de inicio de proyecto: Junio 2016

Fecha de finalización de proyecto: Diciembre 2018

II. INFORME TECNICO

Avance del Proyecto

II.1. Resultado 01. Actividades de Dirección del Proyecto:

Reunión de apertura del Proyecto.

El Cronograma de Actividades oficiales del Proyecto, así como la metodología de trabajo finalmente colegiada y aprobada entre los integrantes del consorcio (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar/ICIDCA, Cuba; Universidad Federal de Pernambuco (UFPE, Brasil), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), fue enviada por el Director del Proyecto Ing. Gustavo Saura del ICIDCA, a todos los participantes involucrados. El seguimiento de dicho Programa, así como la entrega de la documentación trimestral técnica fue discutido en cuanto a las estrategias de implementación y salidas vía correo electrónico.

Actividades de intercambio de especialistas para la disseminación de resultados

Aprovechando los fondos disponibles para acciones de movilidad, el Proyecto empleó algunas estrategias para expandir, potenciar y generalizar los resultados del Proyecto con instituciones científico-académicas, así como empresarios industriales de países de la región latinoamericana y del Caribe no integrantes del consorcio Cuba, Brasil y Mexico, dentro del marco de la cooperación Sur-Sur. Otra modalidad fue disseminar los resultados del Proyecto en otras instituciones académicas que aunque no formaban parte del consorcio, si se ubican en países de la colaboración triangular. En este último caso se escogió Brasil por su característica de país continental y por la vasta tradición y experiencia en la industria sucro-alcoholera.

En este caso se escogió como país fuera de la colaboración tripartita a México y el objetivo de esta actividad fue el de difundir los resultados obtenidos en el Proyecto, exponiendo algunas de las deducciones obtenidas en cuanto a la

validación de las técnicas por ICIDCA, así como la experiencia de investigación lograda por la Universidad Federal de Pernambuco (UFPE, Brasil), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), dentro de las acciones comprometidas. De igual forma la acción tuvo la intención de explorar las posibilidades de poder coordinar con la Universidad Autónoma de México-Unidad Ixtapalapa (UAMI) , actividades de investigación relacionadas con la evaluación de la calidad nutricional de cremas de levadura *Torula* y optimización de algunos parámetros operacionales que conduzcan a reducir algunos costos.

A través de los fondos del Proyecto pudieron ejecutarse visitas oficiales a la la ENCB en Ciudad México. Los especialistas cubanos participaron en intercambios técnicos con investigadores-profesores y estudiantes de ambas instituciones académicas. En la UAMI se logró brindar una asesoría y plan de capacitación a profesores-especialistas que atienden cursos de Post-graduación en Ingeniería de Reacciones de Fermentación, Programa que prevé la capacitación durante el año lectivo de más de 20 estudiantes graduados de especialidades afines con los procesos fermentativos.

Con esta institución se conversaron los intereses en el establecimiento de líneas de interés común en el campo de las biotecnologías dirigidas al mejoramiento medio-ambiental, tratamiento de residuales de la producción de alcohol y bebidas como tequila, así como el análisis de sistemas productivos integrados.

Sobre las visitas a la ENCB se participó en dos Seminarios Departamentales correspondientes al Programa de Doctorado de Tecnología en Alimentos del IPN, donde los especialistas cubanos participaron en un intercambio de ideas y sugerencias con los doctorantes y profesores, exponiendo algunas de las experiencias de la tecnología cubana de producción de levadura *Torula*, así como resultados netamente académicos que constituyeron la base de este diseño tecnológico (experiencias en Planta Piloto, estudios sobre digestibilidad aparente e “in vitro”, evaluación de la reproducción en animales mono-gástricos, entre otros aspectos relacionados con la inocuidad alimentaria).

En esta institución científica se coordinaron futuras acciones de formación de recursos humanos, en este caso tutoría de Tesis de Maestría en Tecnología de Alimentos de estudiante mexicana, sobre la base de la experiencia adquirida a través del Proyecto y apertura de futuras líneas de trabajo que versen sobre la evaluación de cepas de levadura *Torula* y *Saccharomyces* de Destilerías cubanas en cuanto a sus características prebióticas y probióticas para alimento animal en formulados simples o mixtos para ambas especies, aprovechando el enorme potencial que pueden tener sub-productos de la industria sucro-alcoholera de bajo nivel agregado (Ej. Vinazas de destilería).

Se participó en un Encuentro Bilateral entre especialistas del ICIDCA y los profesores doctores del Programa de Doctorado de Tecnología en Alimentos del IPN donde se abordó la posibilidad de ejecución de acciones de colaboración científica entre ambas instituciones que puedan dar continuidad a la profundización en cuanto a la caracterización de cremas de levadura (*Torula* y *Saccharomyces*) a través de técnicas novedosas y no destructivas.

Estas visitas a instituciones académicas mexicanas permitieron la adquisición de importantes donaciones de literatura técnica de cuya autoría forman parte muchos de estos profesores mexicanos. La información contenida en estos libros resulta de obligado material de consulta y contribuirán a la formación docente de cualquier estudiante o especialista de nuestro país vinculado a la temática de la producción de alimentos. Se relacionan a continuación:

- Advances in Heat Transfer Unit Operations. Baking and Freezing in Bread Making. Edit. G. Calderón; G. Gutiérrez; K. Niranjana. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Ratón-Londres-Nueva York. 2017.
- Food Nanoscience and Nanotechnology. Edit. H. Hernández; G. Gutiérrez. Springer Science + Business Media, Nueva York. 2015.
- Food Engineering. Integrated Approaches. Edit. G. Gutiérrez; G. Barbosa; J. Welti, E. Parada. Springer Science + Business Media, LLC. 2008.
- Tecnología Ambiental: Ciencias Aplicadas. Edit. J. Morales; J. Mendoza. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Universidad del Papalopán, México, DF. 2012.

- Microbiología de los alimentos. Edit. I. Guerrero, B.E. García, M. C. Wacher y C. Regalado. LIMUSA, Noriega Editores, México, DF. 2014.
- Ciencia y Tecnología de Carnes. Edit. Y. H. Hui, I. Guerrero, M. Rosmini. LIMUSA, Noriega Editores, México, DF. 2006.

En ambas instituciones académicas mexicanas se abordó también la importancia y el interés de firmar Convenios Marcos de Colaboración Científica, el cual pudo llevarse a término con la UAMI y se sentaron las bases para la firma con la ENCB/IPN. Ambos Convenios deben amparar de forma legal acciones de colaboración en líneas de investigación de interés y provecho mutuo, incluyendo la formación de recursos humanos (maestrías y doctorados), así como el intercambio de especialistas entre las instituciones para brindar asesorías, conferencias, clases magistrales y otras modalidades docentes.

Por otra parte las visitas realizadas durante el año 2017 al Grupo ZUKER de México resultaron provechosas en el sentido de que este Grupo mexicano ha sido el proveedor de numerosos insumos necesarios para ejecutar los experimentos a nivel de Planta Piloto y a escala industrial de aprovechamiento de las vinazas de destilerías como única fuente de Carbono y energía. Insumos tales como nutriente de levadura en sustitución de mieles finales, sales nutrientes, antiespumantes, entre otros han sido cruciales para la ejecución de numerosas actividades de este proyecto y para el desarrollo de la Tarea Técnica y validación de la tecnología.

En reuniones desarrolladas con este Grupo se evaluaron otras opciones y variantes de estas materias primas dirigidas a mejorar la productividad y perfeccionar el diseño tecnológico actual, así como la posibilidad de poder utilizar sus instalaciones industriales para la introducción de resultados científicos obtenidos a través de acciones conjuntas entre instituciones mexicanas y cubanas (implementación de tecnología de tratamiento de residuales en la industria alcoholera mexicana, estrategias de trabajo de formulaciones de nutrientes para plantas de levadura *Torula* y destilerías de alcohol). De igual forma esta empresa está interesada en financiar y patrocinar un Programa de Capacitación para la industria azucarera mexicana, verticalizando en temas como tratamiento de residuales y producción de alcohol. En este sentido existe un gran interés en que

el Programa pueda estar apoyado académica y científicamente de forma conjunta por UAM-I y ENCB por México e ICIDCA por Cuba.



Reunión entre especialistas, empresarios y funcionarios Estado de Jalisco y Cuba. De izq. a derecha E. Cardona (Presidente ZUKER), M. Hernández (Esp. Relac. Int. ICIDCA), R. Varela (Director CENCA, Cuba), M. Cardona (J' Negocios ZUKER), G. Saura (Jefe Proyecto FPPG), funcionarios del Gobierno de Jalisco.

Con respecto a las actividades de diseminación en otras instituciones académicas brasileñas, se escogió a la Universidad Federal de Pernambuco. Esta universidad brasileña se ubica en la región del nordeste brasileño, territorio que se ha caracterizado por ser uno de los más desfavorecidos en este país en cuanto a su desarrollo, pero que sin embargo posee una tradición en la industria azucarera y en los últimos años muchos grupos de esta Universidad han intentado aplicar los resultados científico-técnicos para el impulso económico y social de esta región. La acción en sí consistió en la participación de una especialista del ICIDCA en impartir una conferencia en Seminario Docente del Núcleo de Ingeniería Metabólica de la Facultad de Ingeniería Bioquímica durante el mes de septiembre del 2016 ante todos los estudiantes brasileños insertados en el Laboratorio de Genética. La especialista expuso en su disertación la experiencia de la tecnología cubana de producción de levadura forrajera *C. utilis* para reducir la carga contaminante en destilerías de alcohol como estrategia medioambiental y para la producción de núcleo proteico para la alimentación animal, resultados fruto de este Proyecto.



Visita al Ingenio S. J. del Tule, Colima. Foto Superior: Ing. L. Peñalver (J' Producción), R. Varela (Director CENCA), E. Cardona (Presidente ZUKER), M. Hernández (Esp. Rel. Intem. ICIDCA), Ing. G. Saura (Jefe Proyecto FPPG), A. Alfonso (Téc. y Admin. Proy. FPPG), entre otros tecnólogos del CA.



Participación de los socios del consorcio en Evento Internacional



Reunión de cierre del Proyecto en Ciudad México

- I. Como actividad de cierre del Proyecto, el día martes La reunión tuvo como objetivo analizar los resultados y avances logrados, identificar las lecciones aprendidas en el marco de la colaboración e identificar próximas acciones

II.2. Resultados

. Antecedentes del Proyecto.

Este Proyecto pretende alcanzar una actualización para el control microbiológico de la industria alcohólica a partir de la caña de azúcar y sus producciones asociadas de levaduras grado alimento (cremas *Saccharomyces* y *Candida utilis* a partir de vinazas). Será realizado un estudio eco-sistemático de la microbiota de levaduras en destilerías cubanas y fábricas de levadura forrajera adyacentes. Será desarrollada una estrategia de caracterización microbiológica polifásica, incluyendo criterios fenotípicos y genotípicos, estableciendo procedimientos de control, en aras de optimizar la eficiencia industrial y abrir un nuevo enfoque acerca de las normas de inocuidad alimentaria que deben regir las producciones de levaduras grado alimento a partir de los derivados de la caña de azúcar. Este Proyecto persigue estimular una red de cooperación científica que involucre esquemas de energías renovables en la región latinoamericana y del Caribe, así como valorizar los derivados de la caña de azúcar para alimentos. Los beneficios del Proyecto tendrán un impacto amigable con el medio ambiente, con reflejos en la obtención de co-productos de alto valor nutricional derivados de la industria alcohólica. La propuesta también contribuirá a la explotación autónoma sostenible de los bio-recursos en países en vías de desarrollo.

El Proyecto garantizará las herramientas de control para reducir los índices de consumo de miel de caña de azúcar y maximizar la eficiencia de productores

de bio-etanol industrial como energía limpia. Los fabricantes anexos de levadura grado alimento, podrán de forma sostenible producir aditivos para la alimentación animal aplicando las exigencias actuales de la estrategia nacional de inocuidad alimentaria. Esta situación será directamente proporcional a la estabilidad laboral en áreas rurales y debe estimular costos competitivos para el etanol y sus productos derivados con valor agregado. El Proyecto proveerá independencia en la adquisición de insumos como cepas de levaduras productoras que generalmente son comercializadas por compañías del primer mundo, asegurando de esta forma sustitución de importaciones y productos basados en levaduras que cumplan los requisitos de calidad y seguridad establecidos para los ganaderos.

Este proyecto integrado y a la vez flexible podrá expandirse hacia otros países miembros del Grupo de los 77 que posean tradición en el sector sucro-alcoholero. El Proyecto, al estimular el crecimiento en el sector de las energías renovables, favorecerá la reducción del efecto de gases invernadero y fortalecerá una economía más amplia basada en los recursos biológicos. La actualización para esta industria ayudará directamente a alcanzar la eficiencia global del proceso, mejorando y optimizando la sostenibilidad de las industrias beneficiadas y un mejor aprovechamiento de capacidades instaladas y nuevas inversiones. Consecuentemente serán reducidos los efluentes altamente contaminantes de la fabricación de etanol que afectan los ecosistemas evaluados. Los efectos obtenidos favorecerán directamente la cadena alimentaria al obtener co-productos generados por esta industria con un alto valor para la alimentación animal como proteínas y probióticos ricos en minerales y vitaminas. Los resultados del Proyecto contribuirán al perfeccionamiento de los servicios de asistencia técnica a productores, persiguiendo superar la dependencia en los combustibles fósiles, protegiendo la vida y el ambiente de los habitantes de las áreas beneficiadas.

ACTIVIDAD 01

PROPUESTA DE METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN PARCIAL POLIFÁSICA DE LEVADURAS DE DESTILERÍAS.

EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL POTENCIAL PRODUCTIVO DE CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS EN DESTILERÍAS G.E. AZCUBA

Resumen

Se realizó una evaluación pormenorizada y más completa del potencial productivo de las cepas de levadura aisladas en la Destilería del G.E. AZCUBA UEB Destilería “A. Rodriguez” ubicada en la región oriental del país, provincia Las Tunas. Para dar cumplimiento a estos objetivos se inspeccionó de forma puntual el estado de los métodos de controles analíticos y microbiológicos del proceso fermentativo, así como aspectos tecnológicos que pudieran estar afectando la producción. De forma paralela se evaluaron

a través de un muestreo puntual las propiedades y criterios de calidad más relevantes para algunas materias primas fundamentales como mieles tributadas, fermento comercial inoculado, agua de proceso; así como los productos derivados de la fermentación destinados a alimento animal como la crema *Saccharomyces* y el fondaje de corbatos del cual deriva. No fueron encontradas alteraciones en cuanto a las mieles tributadas al proceso colectadas, así como el agua de proceso. Sin embargo la calidad de la crema *Saccharomyces* obtenida resultó cuestionable, no desde el punto de vista físico-químico, pero si en cuanto a su composición nutricional y calidad microbiológica, aspectos que deben ser chequeados con regularidad paralelamente a una revisión del procedimiento para su optimización. Resultó de interés encontrar que la levadura que domina el proceso fermentativo en sala, no corresponde al mismo fenotipo WLN-agar con respecto a la levadura añadida al proceso, la cual es importada. Este aspecto debe continuar con estudios más profundos referentes a una apropiada caracterización fisiológica de estas levaduras.

Introducción

En el mes de septiembre del presente año se realizó una visita a la destilería del G.E. AZCUBA localizada en la región oriental del país, provincia Las Tunas: UEB Destilería Amancio Rodríguez (“Sevilla”), la cual se encontraba produciendo en ese periodo alcohol flema.

Esta unidad incluye en su surtido alcohol extrafino, aguardiente y alcoholes técnicos, sin embargo hace algunos meses esta fábrica ha venido confrontando dificultades con el cumplimiento de algunos indicadores productivos, especialmente el índice de consumo de miel, cuyo cumplimiento real supera los valores establecidos en plan (353 kg miel/hL alcohol), así como la eficiencia en fermentación con valores considerados de los más bajos en el país (72,6%).

Ante esta situación, se procedió a inspeccionar de forma puntual el estado de los métodos de control de proceso desde el punto de vista de la aplicación de la Química Analítica y la Microbiología, la metodología de manejo de los procesos fermentativos, así como aspectos tecnológicos que pudieran estar afectando la producción.

Bajo estas condiciones operacionales se procedió a realizar el aislamiento de la levadura de producción residente en la sala de fermentación, determinar su potencial productivo en fábrica, y comparar fisiológicamente con el fermento comercial empleado.

De forma paralela se evaluaron a través de un muestreo puntual las propiedades y criterios de calidad más relevantes para algunas materias primas fundamentales como mieles tributadas, fermento comercial inoculado, agua de proceso; así como los productos derivados de la fermentación destinados a alimento animal como la crema *Saccharomyces* y el fondaje de corbatos del cual deriva.

El objetivo de este levantamiento de información, fue el de evaluar a lo largo de todo el proceso fermentativo el desempeño y potencial de la cepa de levadura imperante en la producción a partir de mieles tributadas típicas y bajo las condiciones industriales “in situ”.

Materiales y Métodos:

Muestras biológicas y materias analizadas:

La Tabla 1 refiere las muestras procesadas y su descripción:

Tipo	Descripción
Miel	M1 colectada en Tanque de miel de proceso en fecha 14/09/16
Miel	M2 colectada en fecha 16/09/16
Agua de proceso	Colectada en fecha 14/09/2016
Levadura comercial	Paquete sellado de levadura seca activa enológica SAF-OENOS™, SAFMEX S.A. de C.V., Toluca, México. Lote 87701, con fecha de caducidad (mes/año) 12/2015.
Pre-fermentador	Colectada de Pre-Fermentador 1 en fecha 14/09/2016. Temp. 35°C
Fermentador	Colectada de Fermentador 4 en fecha 14/09/2016. Ciclo 10 hr, Temp. 40°C, 15 °Bx corrida, pH 4.3.
Fondaje de Fermentador	Colectado de Fermentador 4 en fecha 15/09/2016.
Crema Saccharoymces	Colectada del Tanque de Despacho en fecha 15/09/2016

Análisis Físico -Químicos

La materia seca gravimétrica (MSG) fue determinada por desecación a 105°C durante 12 horas hasta peso constante. Las cenizas por desecación e incineración a 550°C, el nitrógeno total Kjeldahl (Nt) por digestión en presencia de H₂SO₄ concentrado, destilación en medio alcalino del NH₃ y valoración con HCl (Vázquez, et. al., 2013).

Se cuantificó fósforo orgánico expresado como P₂O₅ por el método colorimétrico en presencia de metavanadato de amonio. Los Azúcares Reductores Totales (ART), Azúcares Reductores Libres (ARL) y Azúcares Reductores Fermentables (ARF) por el método clásico de Eynon y Lane (1923). (Vázquez, et. al., 2013).

El contenido de lodos fue cuantificado mediante centrifugación (Vázquez, et. al, 2013), el pH determinado potencio-métricamente y los grados Brix medidos a través de aerómetro registrado y corregido con temperatura.

La materia seca volumétrica (MSV) fue cuantificada por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos en tubo capilar de vidrio, con la posterior medición de la altura de la masa húmeda. La densidad aparente se calculó mediante el peso en balanza analítica referido a una unidad de volumen.

Test de fermentación

Para evaluar las mieles los ensayos se desarrollaron con levadura seca activa alcoholera de referencia para producción de alcohol industrial (FERMENTIS®Ethanol Red, México), ajustando las condiciones de fermentación a un contenido de ART= 120 ± 4 g/L, pH 4.5 e incubación a 37°C estática durante 24 horas. Los cálculos de la eficiencia en fermentación fueron realizados a través del contenido de Azúcares consumidos y el grado alcohólico determinado a través de densitometría digital (NC 290: 2007).

Para el caso de la evaluación del fermento comercial se procedió a montar las fermentaciones con una miel de referencia procedente de la UEB “Jesús Rabi”, Matanzas, con todos los parámetros normados (NC 715: 2009) para esta materia prima.

Análisis microbiológicos

Se realizó la enumeración de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) mediante la técnica de placa vertida a 30°C (NC-ISO 4833: 2011), así como la enumeración de levaduras y mohos (LM) mediante la técnica de placa vertida a 30° C en Medio Extracto de Levadura-Dextrosa-Cloranfenicol-Agar (NC-ISO 1004: 2014).

La detección de pureza y viabilidad para *Saccharomyces cerevisiae* fue realizada por siembra en medio Wallerstein Nutrient-Agar a 30°C e incubación durante 5 días.

Resultados y Discusión

Caracterización de materias primas (mieles tributarias) y agua de proceso:

Durante la visita los especialistas de la fábrica refirieron que la instalación recibe fuera de campaña (período comprendido) en muchas ocasiones, mieles tributarias que no cumplen la norma de calidad para fermentación en algunos parámetros, mostrando visualmente una elevada viscosidad y descomposición por su fermentescibilidad, incluso desde el momento de su recepción. Estas mieles han llegado a representar hasta un 25,4% de las mieles tributadas recibidas hasta septiembre del 2016. Esta situación, sumada a que no existe ningún sistema de tratamiento para esta materia prima, y que el ingenio no dispone de tanques de almacenamiento adecuados empeora esta situación y pudiera ser un factor que coincida con el elevado índice de consumo de miel.

La Tabla 2 muestra las características físico-químicas evaluadas para las dos mieles bajo estudio, observándose que ninguna exhibió alteraciones en cuanto a las especificidades de calidad regidas por la NC 715: 2009, u otros criterios que aunque no están normados sí constituyen indicadores de la calidad nutricional de este importante insumo.

Tabla 2. Características físico-químicas de mieles tributarias a la Destilería "A. Rodríguez" en septiembre/2018.

Muestra	ART % (p/p)	ARL % (p/p)	ARF % (p/p)	MSG % (p/p)	Ceniza % (p/p)	Lodos % (p/p)	°Brix	pH	Nt % (p/p)	P ₂ O ₅ % (p/p)
M1	59.35	14.40	55.39	82.45	9.06	10.0	90.56	5.31	0.27	0.23
M2	54.67	17.80	50.82	80.72	8.60	8.0	89.16	5.24	0.24	0.35

% (p/p): 100 g en 100 gramos de miel física. En el caso de la determinación de cenizas los resultados se expresan en base a 100 gramos de materia seca.

Solo la Miel 1 mostró valores de lodos por encima de los normados (hasta un 8.0 % p/p). Si bien es cierto que el conocimiento del contenido de lodos o fangos resulta de especial interés, debido a la imposibilidad práctica de contar con algún tratamiento de defanquización o clarificación en la actual industria alcoholera nacional, hay que tomar en cuenta que aprox. un 21 % de las mieles tributarias a Destilerías del G.E. AZCUBA (n=61) del último trienio no cumplen esta especificidad, mostrándose una media muestral para este indicador de 6.1 ± 2.4 . Esta situación nos conduce a que a pesar de que esta miel mostro un valor ligeramente superior al máximo admisible, no constituye una alteración significativa a la cual pueda adjudicarse una baja calidad fermentativa.

Tabla 3. Parámetros del test de fermentación realizado a las mieles tributarias a la Destilería "A. Rodríguez" en septiembre/2017.

Muestra	°Bxi	°Bxf	pHi	pHf	ARTr (g/L)	ARTc (g/L)	Perdida másica (g)	Grado alcohólico (% v/v)	Eficiencia fermentación (%)
M1	17.8	8.0	4.51	4.21	7.0	117.0	14.5	6.53	86.4
M2	17.8	8.0	4.51	4.19	7.6	110.3	23.15	6.64	93.2

La Tabla muestra los valores promedios de 2 fermentaciones por cada miel ensayada.

°Bxi: °Brix inicial,

°Bxf: °Brix final, pHi: pH inicial, pHf: pH final, ARTr: Azúcares Reductores Totales residuales, ARTc:

Azúcares Reductores Totales consumidos (Azúcares Fermentables añadidos), Eficiencia en

Fermentación: Calculada en base a Azúcares Fermentables añadidos, Perdida másica: Perdida másica del medio de fermentación (Determinación indirecta de la generación de CO₂ durante la actividad fermentativa).

Por su parte los azuceres fermentables se comportaron en un rango típico para miel B (50-65 % p/p) cuya calidad fermentativa es superior a la miel final, aunque por supuesto encarece el costo de la producción. Una materia prima carbonada con estas características debe favorecer el cumplimiento del plan base 52 % de ART, con un buen desempeño fermentativo teniendo en cuenta los valores respectivos de ART para las mieles bajo estudio (superiores a 54 % p/p).

Esta situación fue corroborada mediante la realización del test de fermentación en ambas mieles, obteniéndose eficiencias de fermentación superiores a un 86 %, calculadas mediante el grado alcohólico corregido a 20°C/azúcares consumidos o fermentables y el rendimiento teórico (0.51 g/g). Estos valores de eficiencia resultaron muy aceptables

teniendo en cuenta que no todos los azúcares fermentables son convertidos a etanol y CO₂, sino también a biomasa de levadura, glicerol, ácidos orgánicos, entre otros minoritarios.

Tabla 4. Indicadores de contaminación microbiológica en las mieles tributarias a la Destilería “A. Rodríguez” en septiembre/2017.

Miel	Microorganismos a 30°C (UFC/g)	HF y levaduras (UFC/g)
M1	6.0 x 10 ²	< 10
M2	n.r.	n.r.

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias por gramo de miel,
n.r. No realizado. HF: Hongos filamentosos

En cuanto a la presencia de contaminantes microbiológicos en las mieles colectadas, ambas cumplen los requisitos establecidos para la NC 585:2013 para la cual clasifica este insumo dentro del Grupo 16 (Alimentos destinados al consumo animal), por constituir una materia prima de origen vegetal. También los resultados cumplen los requisitos de calidad microbiológica para mieles finales destinadas a procesos fermentativos, por encontrarse los valores de aerobios mesófilos totales y mohos/levaduras dentro del rango de valores promedios históricos encontrados para esta materia prima en nuestro país: ≤104 UFC/gr de miel para aerobios mesófilos totales y < 103 UFC/gr de miel para hongos y levaduras (Villa et al, 2001).

El agua empleada en el proceso industrial no exhibió presencia de levaduras viables crecidas en medio de cultivo WLN-Agar, luego de 5 días de incubación a 30°C para el límite de sensibilidad de la técnica ensayada (< 10 UFC/mL). Como dato de interés se detectó cualitativamente la presencia de bacterias mesófilas aerobias con fenotipo mucóide (propio de producción de exo-polisacáridos) en presencia de 50 g/L de glucosa. Estos fenotipos no volvieron a encontrarse en muestras propias de la sala de fermentación (Pre-Fermentador y Fermentador), por lo que su detección en el agua se consideró como un fenómeno aislado e irrelevante.

Calidad del fermento (levadura seca activa comercial)

A pesar de que los especialistas de la fábrica refirieron la posible incidencia de los bajos valores de eficiencia de fermentación por estar trabajando con una levadura seca activa correspondiente a un lote vencido, la evaluación realizada a partir de un paquete sellado de la misma por inspección simple no evidenció señales de hidratación, ni alteraciones en su estado de conservación en cuanto a su textura, color y olor.

Se detectó una viabilidad de 2.7 x 10⁹ UFC por gramo, para un único morfotipo de levadura en medio WLN-Agar, sin presencia de bacterias aerobias mesófilas contaminantes para el límite de sensibilidad de la técnica ensayada (< 10 UFC/g). Estos resultados cumplen los parámetros de viabilidad y pureza estandarizados para este tipo de insumo, aun a pesar de la caducidad del lote ensayado.

En la Tabla 5 se muestra el desempeño fermentativo de este fermento realizado en una miel de referencia (normada por la NC 715: 2009 para todos los parámetros de calidad) donde los valores revelan un comportamiento aceptable con eficiencia cercana al 93 %.

Tabla 5. Parámetros del test de fermentación realizado a lote de levadura seca activa SAF-OENOS®.

Tabla 5. Parámetros del test de fermentación realizado a lote de levadura seca activa SAF-OENOS®.

$^{\circ}\text{Bx}_i$	$^{\circ}\text{Bx}_f$	pH _i	pH _f	ARTr (g/L)	ARTc (g/L)	Perdida másica (g)	Grado alcohólico (% v/v, 20°C)/	Conteo levaduras final fermentación	Eficiencia fermentación (%)
17	10	4.51	4.19	9.6	94.3	23.6	6.51	1.9×10^7	92.2

La Tabla muestra los valores promedios de 2 fermentaciones por cada miel ensayada.

$^{\circ}\text{Bx}_i$: $^{\circ}\text{Brix}$ inicial,

$^{\circ}\text{Bx}_f$: $^{\circ}\text{Brix}$ final, pH_i: pH inicial, pH_f: pH final, ARTr: Azúcares Reductores Totales residuales, ARTc:

Azúcares Reductores Totales consumidos (Azúcares Fermentables añadidos), Eficiencia en

Fermentación: Calculada en base a Azúcares Fermentables añadidos, Perdida másica: Perdida másica del medio de fermentación (Determinación indirecta de la generación de CO₂ durante la actividad fermentativa).

Evaluación de la calidad del proceso fermentativo (Áreas de Propagación y fermentación)

Por la ubicación geográfica de la fábrica en la zona oriental del país, donde la temperatura ambiental es por lo general elevada, aun en esta época del año; sumado a las propias características exotérmicas de esta fermentación, la temperatura puede constituir un factor de alto impacto en las eficiencias al no disponer la fábrica de un sistema de enfriamiento adecuado.

El Pre-fermentador No. 1 muestreado exhibió una temperatura final a su descarga de 35°C y mediante el conteo de células de levaduras viables (UFC/mL) en medio rico diferencial WLN-Agar se cuantificaron por este método de mayor precisión una concentración de 84×10^6 (millones), lo cual puede considerarse un bajo conteo celular, teniendo en cuenta la calidad de la levadura seca añadida y su buen desempeño a 37°C mostrado en el test de fermentación ensayado a nivel de laboratorio (Tabla 5).

No se observó la presencia de levaduras no-Saccharomyces o contaminantes en un por ciento representativo de la población de levaduras inoculadas (> 10 %). Se apreció un morfotipo único y por tanto de alta pureza de levadura, sin presencia de bacterias aerobias mesófilas contaminantes para el límite de sensibilidad de la técnica ensayada (< 10 UFC/mL). Este morfotipo de levadura fue aislado (ARP-1) y preliminarmente identificado mediante galerías API ID32C bioMérieux S A (Francia).

Como hecho a notificar se cuantificó la formación de etanol en el área de propagación en concentración de hasta 3.6 % v/v, para 10 $^{\circ}\text{Bx}$ de corrida (\approx 30.4 g/L ART) lo cual constituye un indicador de un inadecuado balance de la fuente de carbono, hecho que también pudiera incidir directamente en el elevado consumo de miel. Durante la visita fue

orientado bajar los 0Bx de corrida en 1 grado (90Bx) correspondiente a aproximadamente 18.8 g/L de ART para esas mieles tributarias, observándose una disminución del grado alcohólico en 2,57% v/v.

Después de este reajuste, se lograron significativos aumentos en los conteos celulares (150 millones de células/mL) aún insuficientes pero superiores a los 80-90 millones de células/mL que se detectaron durante la visita tanto mediante método directo por tinción con azul de metileno y observación al microscopio óptico como por siembra en medio de cultivo diferencial.

En cuanto a la sala de fermentación, según el análisis de ART para batición preparada a partir de las mieles bajo estudio, para estas dos un Bx de corrida preparado a 15° corresponde a un aproximado de 89 g/L de ART por nuestros análisis, por lo que asumimos que de forma real el Fermentador No. 4 a partir del cual se realizó el muestreo se encontraba trabajando con un Bx de corrida real menor que 120 g/L.

Este fermentador mostró un conteo de células de levaduras viables (UFC/mL) de 64×10^6 (millones) por siembra en medio rico diferencial WLN-Agar, los cuales se consideraron dentro de los valores promedios cuantificados en Destilerías del G.E. AZCUBA para esta sección. Al igual que para el caso del Pre-Fermentador 1 no se observó la presencia de levaduras no-Saccharomyces o contaminantes en un porcentaje representativo de la población de levaduras inoculadas (> 10 %). El cultivo se apreció puro con un morfotipo único (ARF-4) de levaduras, sin presencia de bacterias aerobias mesófilas contaminantes para el límite de sensibilidad de la técnica ensayada (< 10 UFC/mL).

A pesar de la pureza de los cultivos observada, al analizar de forma conjunta los morfotipos culturales obtenidos en el medio diferencial WLN-Agar, medio que permite discriminar cepas por las características culturales en cuanto a tamaño, borde, distribución de la coloración, superficie y cambio de coloración del medio de cultivo circundante, no existió una correspondencia entre el aspecto de las colonias observadas para la levadura SAF-OENOS® inoculada a las crecidas en el Pre-Fermentador (aislamiento ARP-1) y al Fermentador muestreado (aislamiento ARF-4).

Para estas dos últimas cepas aisladas de la sala de fermentación se realizó un perfil de azúcares (API 32C) mostrado en la Tabla 6, el cual fue coincidente para ambos aislamientos a pesar de que la morfología de las colonias difirió en cuanto a distribución de la coloración.

Tabla 6. Perfil de asimilación de sustratos carbonados para aislamientos levaduriformes en muestras de Pre-Fermentador (ARP-1) y Fermentador (ARF-4). Destilería A. Rodríguez. Celdas sombreadas significan pruebas positivas.

Sustratos Carbonados	ARP-1	ARF-4	Patrón 99.9 % ID <i>S. cerevisiae</i>
	D-Galactosa		
Cicloheximida (Actidiona)			
D-Sacarosa			
N-Acetil-glucosamina			
Ácido láctico			
L-Arabinosa			
D-Celobiosa			
D-Rafinosa			
D-Maltosa			
D-Trehalosa			
2-Cetogluconato potásico			
Metil- α -D-glucopiranosida			
D-manitol			
D-lactosa (origen bovino)			
Inositol			
D-Sorbitol			
D-Xilosa			
D-Ribosa			
Glicerol			
L-Rhamnosa			
Palatinosa			
Eritritol			
D-Melibiosa			
Glucuronato sódico			
D-Melecitosa			
Gluconato potásico			
Ácido levulinico (Levulinato)			
D-Glucosa			
L-Sorbosa			
Glucosamina			

Luego de procesar estos datos en el software apiweb™, bioMérieux SA (Francia) este perfil mostró un porcentaje de identidad con baja discriminación para la especie *Saccharomyces cerevisiae* (ID= 67.5 %, T= 0.65). Si comparamos con un perfil de asimilación típico para *S. cerevisiae* (Patrón 99.9 % ID), se muestra como prueba en

contra la asimilación de la D-Melecitosa para la cual solo existe una probabilidad de un 15 % de que cepas de esta especie la asimilen. En orden decreciente de importancia resultan no coincidentes con el perfil típico las probabilidades de asimilación de la D-Trehalosa (34%) y Palatinosa (28 %).

La Melecitosa es un trisacárido que puede ser parcialmente hidrolizado a glucosa y turanosa (isómero de la sacarosa). De forma interesante la asimilación y fermentación de este carbohidrato se ha visto correlacionada para algunas especies fúngicas con fenotipos tolerantes a temperaturas cercanas a 37°C según Robert et al. en el 2015. Otros autores han planteado que ciertas cepas de *S. cerevisiae* con fenotipo Mlz+ corresponden a aislamientos industriales dotados de una mayor habilidad para el transporte de la melecitosa, y a su vez de un mayor poder de resolución para hidrolizar este azúcar.

El software indicó que para la confirmación de la especie *S. cerevisiae* se deben realizar pruebas complementarias que demuestren la incapacidad de asimilar la arbutina, la lisina, la cadaverina y el nitrato.

La Tabla 7 refleja los principales parámetros de desempeño fermentativo para el aislamiento ARF-4 cuantificados a nivel industrial, bajo las condiciones de operación típicas para esta destilería, con ciclos promedio en la sala de fermentación que oscilan entre 16 y 18 horas.

Tabla 7. Parámetros de desempeño fermentativo para la cepa ARF-4 en Destilería “A. Rodríguez”. Se reportan los valores referidos por el laboratorio de la fábrica.

Parámetro	
Eficiencia en fermentación declarada por la fábrica	72.1 %
Temperatura final	42°C
pH	4.3
Ciclo	20 hr
Parada para destilar	10 hr (falta de fuel)
°Bx final	4.2°Bx
Grado alcohólico	5.7 % v/v, 20°C
Acidez	0.35 gr ac. acético/100 mL batición
ART residuales	10 g/L

Crema *Saccharomyces*:

El valor nutritivo de la levadura inactivada (por evaporación y termólisis) obtenida como subproducto de la producción de etanol varía dependiendo del sustrato utilizado para su crecimiento y también del proceso de recuperación al cual es sometida. Resulta escasa la información sobre la composición química de la levadura recuperada de nuestra actual industria alcoholera y su digestibilidad, a pesar de que su producción posee una gran demanda en nuestro país, esencialmente para la ganadería porcina. Esta levadura puede contener restos de minerales, y algunas fibras residuales derivadas de la propia miel que le da origen, lo cual puede potenciar sus propiedades nutricionales.

A rasgos generales el procedimiento de obtención de crema *Saccharomyces* inactivada en esta fábrica consiste en pasar el fondaje de corbatos fermentados a un filtro vertical

rotatorio para eliminar impurezas. El lodo precipitado se mezcla con agua de limpieza para diluir el etanol remanente y luego se deposita en un tanque receptor de 40-50 m³ de capacidad, para luego pasar a los tanques de decantación con un volumen de 20 m³. Aquí se elimina la parte superficial o claro después de un tiempo de reposo entre 4-5 horas, se chequea que el °Bx corresponda a un 9-10 % y de ahí pasa al termolisador (sistema de intercambiador de placas) y se somete la crema a una temperatura entre 80-85° durante un tiempo de residencia ajustado de forma práctica o empírica por el operador.

En algunas ocasiones estos fondajes todavía pueden tener células de levaduras viables, sin embargo para la muestra colectada no se detectaron estos microorganismos luego de incubar 5 días en medio WLN-Agar, a 30°C para el límite de sensibilidad de la técnica ensayada (< 10 UFC/g).

Con respecto a la crema *Saccharomyces* colectada a partir del tanque de despacho, se apreció una consistencia de la suspensión con viscosidad, olor y color típicos teniendo en cuenta la materia prima que le dio origen: miel.

Las Tablas 8 y 9 muestran las características fundamentales que dictan la calidad de este producto derivado de la fermentación y destinado a la alimentación animal, fundamentalmente porcina.

Tabla 8. Características físico-químicas de la crema *Saccharomyces* muestreada en la Destilería "A. Rodríguez".

Concentración % (g m.s./g crema)	MSV (altura en mm)	Densidad (g/cm ³)	pH	Cenizas % (g/g m.s)	Nt % (g/g m.s.)	Proteína % (g/g m.s.)	P ₂ O ₅ % (g/g m.s.)
13.97	34	1.0043	4.13	9.45	3.74	23.4	0.95

Para la MSV se reportan los resultados obtenidos a partir de una dilución 1:5 de la crema de levadura

De acuerdo a parámetros de calidad referenciados para crema de levadura de destilería inactivada (Perdomo et al, 2004) los valores obtenidos en cuanto a concentración resultaron adecuados, lo cual presupone que el proceso de separación empleado (en este caso decantación) fue adecuado. Sin embargo las cenizas se encontraron ligeramente elevadas, teniendo en cuenta que hasta un máximo de 8.1 % p/ms puede resultar aceptable; este resultado puede alertar sobre la necesidad de optimizar el proceso de lavado de la crema.

Con respecto a uno de los indicadores más importantes desde el punto de vista nutricional, el contenido de Nitrógeno total y por tanto la proteína bruta calculada (Nt x 6.25), el valor obtenido estuvo muy por debajo de los rangos establecidos para esta materia prima, con valores por debajo de un 30 % g de proteína por gramo de materia seca. De igual forma el fósforo expresado como P₂O₅ resultó en valores por debajo de los rangos referenciados. Esta situación puede resultar del inapropiado proceso de lavado y de recuperación de la crema de levadura propiamente dicha.

Esta materia prima para alimento animal clasifica como un alimento cuya composición físico-química permite el crecimiento y supervivencia de microorganismos contaminantes, acorde a la variación de factores como el pH, su acidez total, la actividad del agua que

posee el producto final, entre otros aspectos. De ahí que su producción debe ir estrictamente regulada por aspectos higiénico-sanitarios durante todo el proceso de su obtención, así como su conservación en el tanque de despacho hasta ser extraída de la fábrica.

Con respecto a esta cuestión fue detectada una concentración de microorganismos mesófilos aerobios medianamente aceptable de acuerdo a los valores normados para esta materia prima (Tabla 9), resultando notorio el hecho de encontrar bacterias mesófilas aerobias con fenotipo resistente a 100 µg/mL de cloranfenicol.

Esta situación pudiera requerir una revisión de las condiciones operacionales, así como las Buenas Prácticas de Producción. Se requiere por tanto revisar los aspectos tecnológicos de obtención de este subproducto, medios de medición y control, temperatura de almacenaje, procedimientos de limpieza y desinfección, entre otras.

Tabla 9. Indicadores de contaminación microbiológica en crema *Saccharomyces* muestreada en la Destilería “A. Rodríguez”.

Aerobios mesófilos totales (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)
> 150 x 10 ⁴	< 10

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias por gramo de crema

Conclusiones

La continuidad de ejecución de esta etapa del proyecto permitió realizar una evaluación pormenorizada y más completa del potencial productivo de las cepas de levadura aisladas en la propia fábrica que dominaban el proceso productivo durante el periodo bajo estudio, tanto para la fabricación de etanol como para la obtención de otro subproducto de alto valor nutricional para alimento animal como la crema de levadura.

No fueron encontradas alteraciones en cuanto a las mieles tributarias al proceso colectadas, así como el agua de proceso. Sin embargo la calidad de la crema *Saccharomyces* obtenida resultó cuestionable, no desde el punto de vista físico- químico, pero si en cuanto a su composición nutricional y calidad microbiológica, aspectos que deben ser chequeados con regularidad paralelamente a una revisión del procedimiento para su obtención el cual consideramos debe ser optimizado.

Resultó de interés encontrar que la levadura que domina el proceso fermentativo en sala, no corresponde al mismo fenotipo WLN-agar con respecto a la levadura añadida al proceso, la cual es importada. Este aspecto debe continuar con estudios más profundos referentes a una apropiada caracterización fisiológica de estas levaduras.

Referencias

- NC 290: 2007: Bebidas alcohólicas- Determinación del grado alcohólico en alcoholes, bebidas alcohólicas destiladas, vinos, licores, bebidas alcohólicas preparadas, cocteles y extractos hidroalcohólicos.
- NC 585:2015. Contaminantes microbiológicos en alimentos-Requisitos sanitarios. NC 715: 2009. Miel final (melaza)-Especificaciones.
- NC-ISO 1004: 2014. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25° C.
- NC-ISO 4833: 2011. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de microorganismos. Técnica de placa vertida a 30° C.
- Perdomo, M. C., Vargas, R. E., Campos, G. 2004. Valor nutritivo de la levadura de cervecería (*Saccharomyces cerevisiae*) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar. Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal, 12 (3): 89- 95.
- Robert, V., Cardinali, G., Casadevall. 2015. Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection. A. BMC Biology, 13:18.
- Vázquez, M. et al. 2013. Manual de Técnicas Analíticas para Destilerías. La Habana: Editorial ICIDCA, ISBN 978-959-71-65-35-4.
- Villa, P., Bueno, L. y Valdés, I. 2001. Metodología para la limpieza y desinfección en la producción biotecnológica de derivados de la industria azucarera. Editorial ICIDCA.

ACTIVIDAD 02

Tesis "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE LEVADURAS DE DESTILERÍA"



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Evaluación del potencial probiótico de levaduras de destilería

TESIS

Que como uno de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología
Molecular

P R E S E N T A

KRISTELL TAMAHARA SÁNCHEZ VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. HUMBERTO HERNÁNDEZ SÁNCHEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 18:30 horas del día 6 del mes de diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB para examinar la tesis titulada:

Evaluación del potencial probiótico de levaduras de destilería

Presentada por la alumna:

Sánchez	Villegas	Kristell Tamahara
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro: A 1 6 0 4 2 1		

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Humberto Hernández Sánchez

Dra. Rosa María Ribas Jalines

Dra. Ma Guadalupe Aguilera Areola

Dra. Maribel Cornejo Mazón

M. en C. Blas Esteban Fernández Rendón

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Gerardo Aparicio Quintero



RESUMEN

Un probiótico, de acuerdo con la FAO "es un microorganismo vivo que administrado en cantidades adecuadas confiere un beneficio a quien lo consume". Para saber si un microorganismo es un probiótico se le hacen una serie de pruebas que garanticen su seguridad y sus beneficios. Estas pruebas son: determinación del género, especie y cepa; determinación del potencial probiótico (resistencia a jugos gástricos, sales biliares, pH ácido, etc.), determinación de que es seguro (no produzca toxinas o sea resistente a antibióticos) y pruebas *in vivo* para para garantizar sus beneficios.

Los microorganismos pertenecientes a las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* entre otros géneros) y del género *Bifidobacterium* son los más conocidos por sus propiedades probióticas; sin embargo, también se han estudiado otros microorganismos como *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Propionibacterium acidipropionici* y de levaduras se conoce a *Saccharomyces boulardii* por lo que resulta de interés el estudio de nuevas levaduras con este potencial de ser probióticas.

En este trabajo se realizó la evaluación del potencial probiótico de cepas de levaduras provenientes de la fermentación de melazas para la producción de ron proporcionadas por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de Caña de Azúcar (ICIDCA) en La Habana, Cuba. Las levaduras a probar, previamente identificadas por el ICIDCA, fueron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (L/25-7-12, L/25-7-77, L/25-7-79, L/25-7-80, L/25-7-81, L/25-7-82, L/25-7-86, L/25-7-90, L/25-7-95) y *Candida utilis* (L/3-75-7).

Las cinco cepas con un crecimiento más rápido fueron L/25-7-12, L/25-7-77, L/25-7-79, L/25-7-86 y L/25-7-90, por lo que éstas fueron seleccionadas para evaluar el potencial probiótico *in vitro* encontrándose que las cinco cepas son capaces de crecer bajo condiciones de estrés osmótico de hasta 70% de sacarosa y de estrés salino de hasta 12% de NaCl; la mejor temperatura de crecimiento fue de 37°C. Tienen un buen crecimiento a pH de 4 y 5.8 así como en presencia de 0.3 y 0.5% de sales biliares, por lo que es muy probable que pueden tolerar el paso por el tracto gastrointestinal. Asimismo, presentan un alto porcentaje de hidrofobicidad y capacidad de autoagregación por lo que también es probable que tengan una buena adherencia a la mucosa intestinal. Por lo tanto, estos resultados obtenidos *in vitro* demuestran que las cinco cepas poseen características fisicoquímicas y biológicas semejantes a las de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

ACTIVIDAD 03

EVALUACIÓN “IN VITRO” DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DESEADAS EN CEPAS SACCHAROMYCES SELECCIONADAS. COMPARACIÓN CON FORMULACIONES COMERCIALES BASADAS EN LEVADURAS.

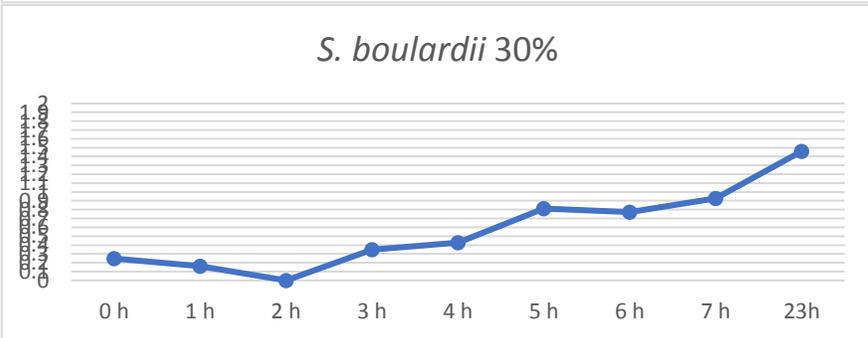
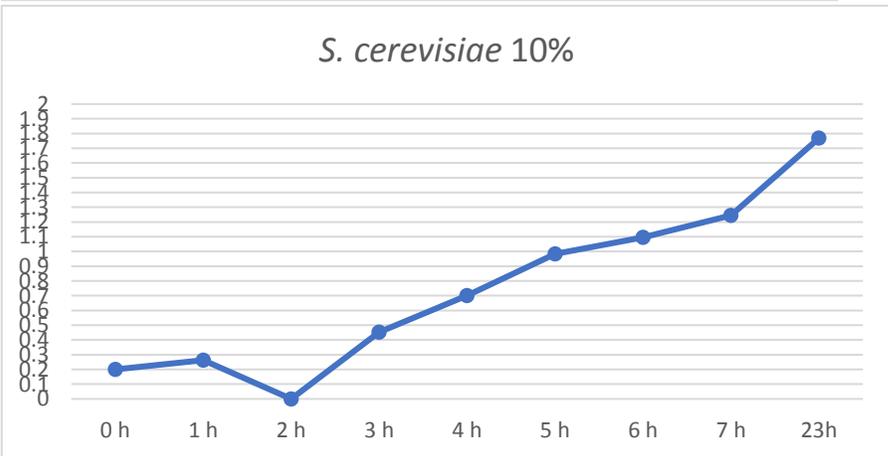
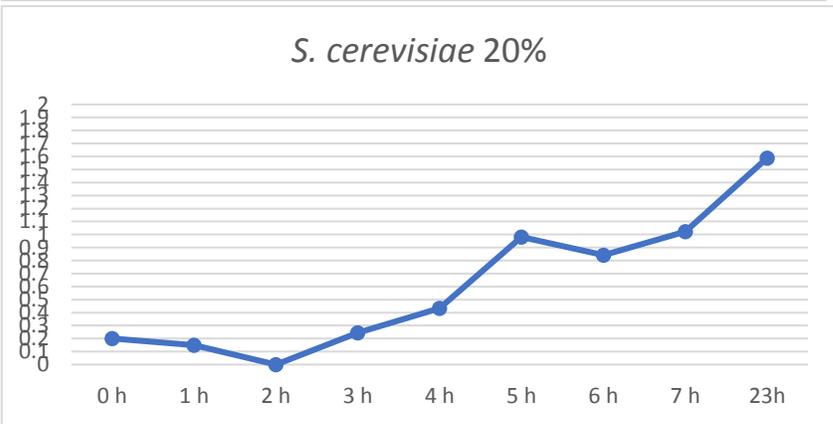
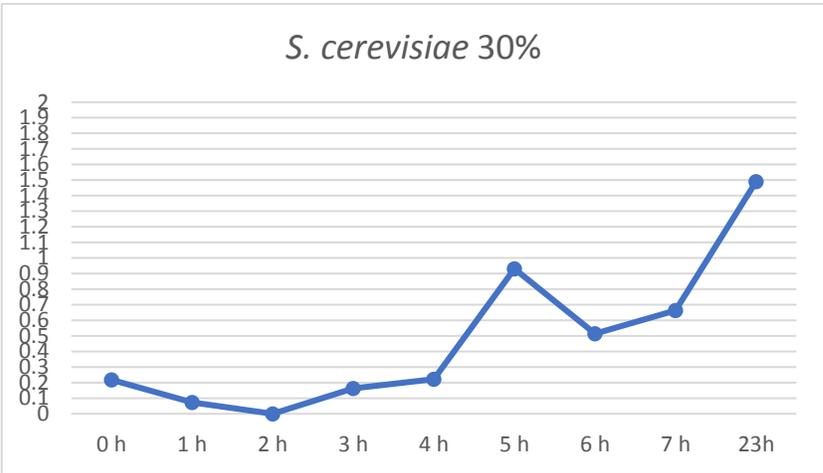
En este trabajo se realizó la evaluación del potencial probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-12, utilizada en la fermentación de la caña de azúcar para la producción de ron, la cual fue seleccionada de otras cinco por su capacidad de crecimiento rápido en medio YPD. Las pruebas se realizaron junto con una cepa control que fue *S. boulardii* aislada de cápsulas de suplemento FloratilR, ya que se ha determinado que esta cepa tiene capacidades probióticas.

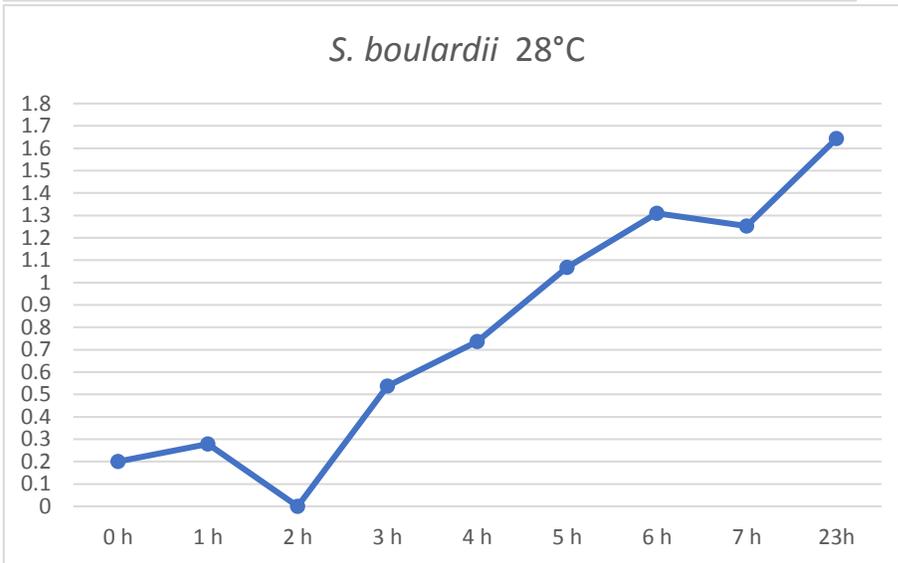
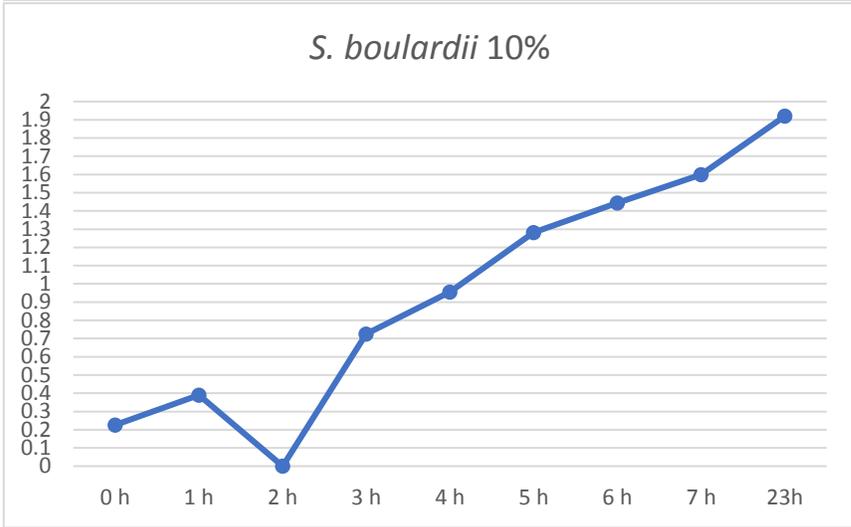
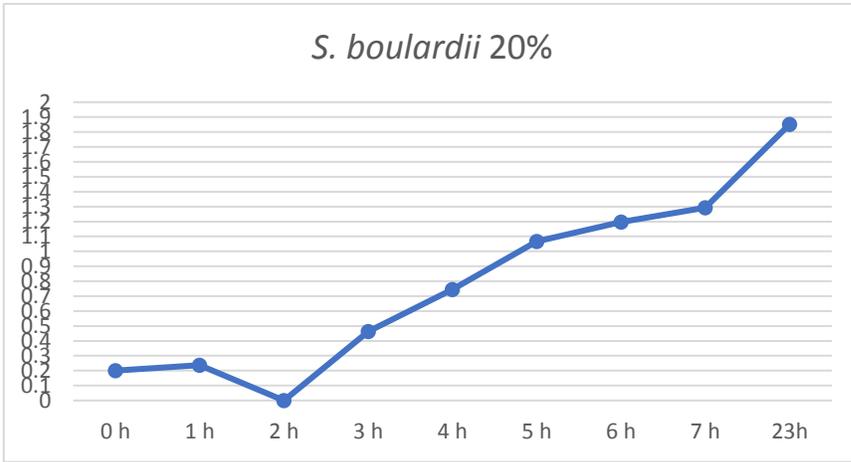
Primeramente, se realizó la prueba de tolerancia a estrés osmótico a diferentes concentraciones de sacarosa (10, 20, 30, 40 y 50 %) ya que es una levadura obtenida de la fermentación de la caña de azúcar por lo tanto que sobreviva y además crezca en altas concentraciones de sacarosa le proporciona un mayor aporte comercial.

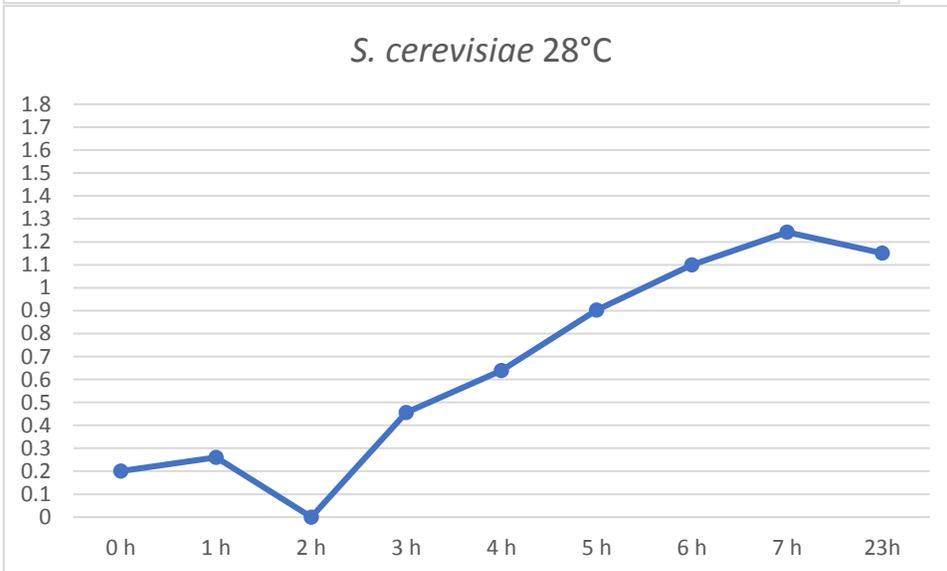
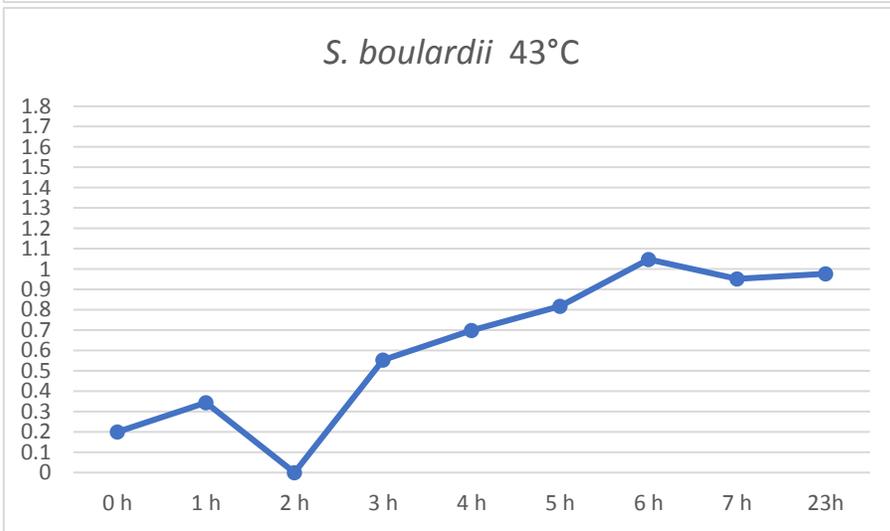
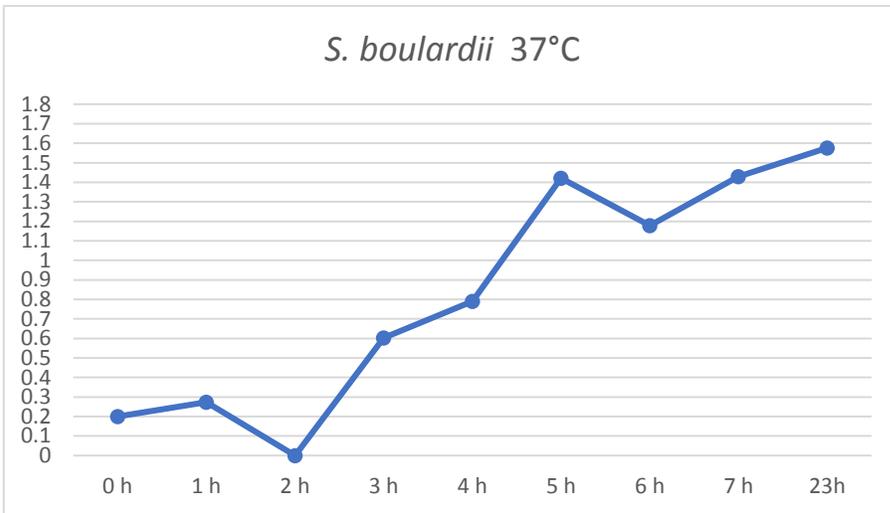
En la prueba de crecimiento a diferentes temperaturas se midió la absorbancia a 28°C, 37°C y 42°C observando el mejor crecimiento a 37°C para todas las levaduras y el menor crecimiento a 42°C, lo cual es ideal para un probiótico ya que es la temperatura corporal.

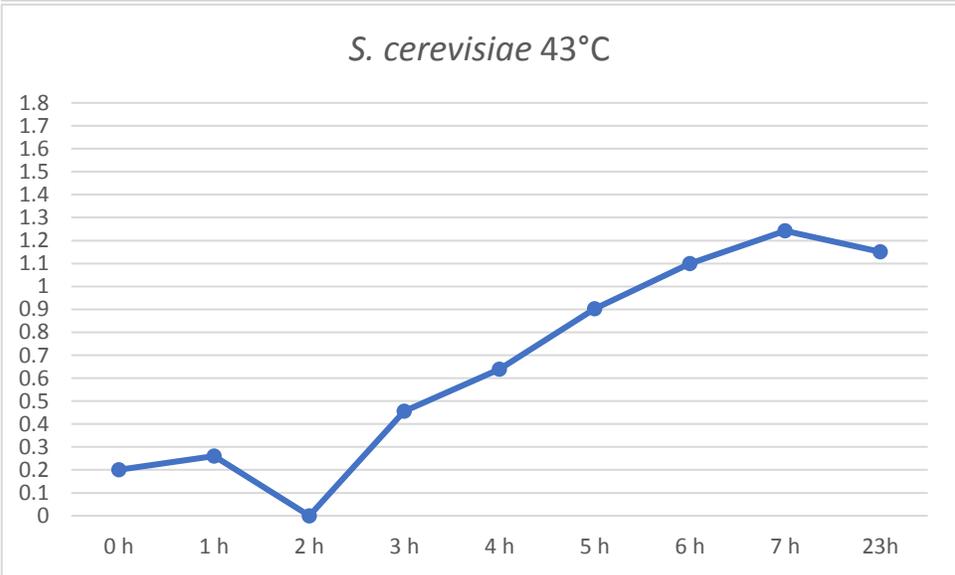
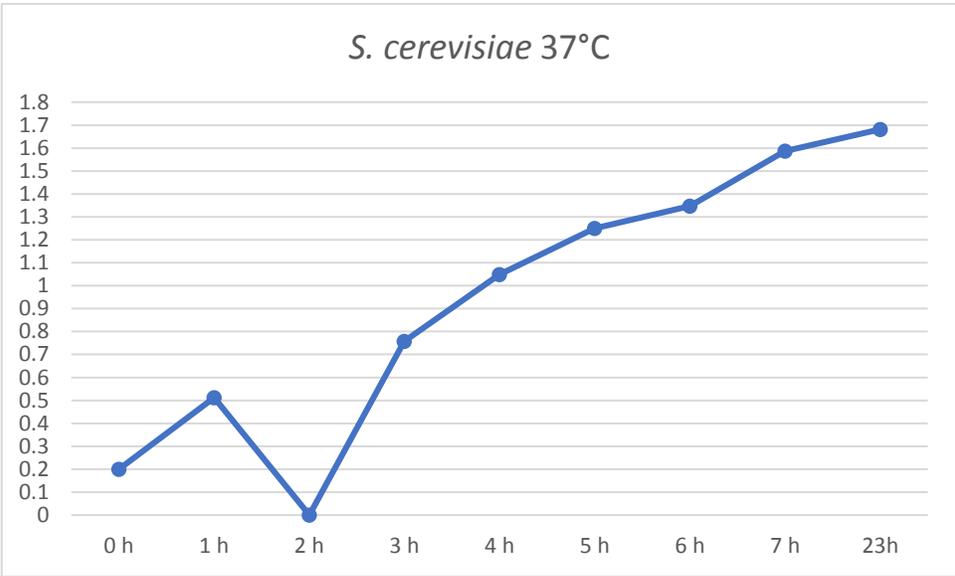
La determinación de hidrofobicidad permite hacer una comparativa de qué tanto se adhiere la levadura a una célula, ya que para la adhesión es fundamental que exista una interacción hidrofóbica entre el microorganismo y el sustrato de contacto, otro parámetro necesario para ser probiótico. Las características físico-químicas de la pared celular bacteriana, tanto como la naturaleza de la superficie a la que se adhiere, influyen sobre los fenómenos de autoagregación y adhesión. En esta prueba *S. cerevisiae* L/25-7-12 mostró un porcentaje de hidrofobicidad medio.

Los resultados obtenidos de la levadura de *S. cerevisiae* L/25-7-12 demostró tener características muy similares a la cepa probiótica *S. boulardii*.







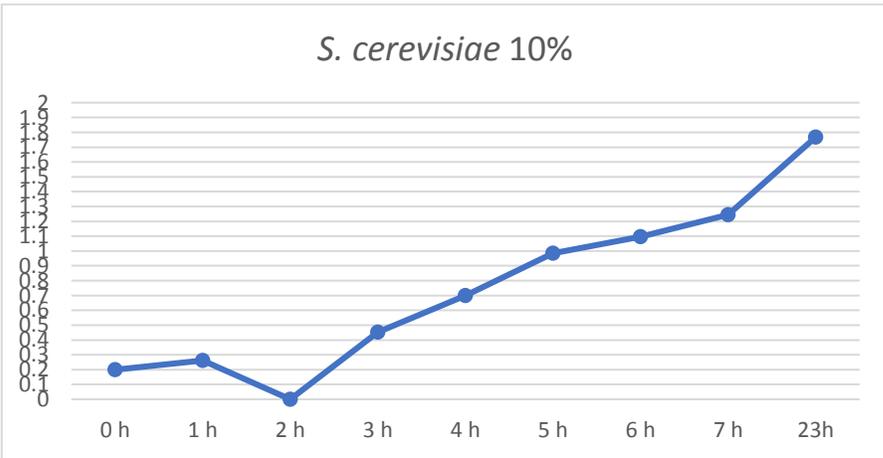
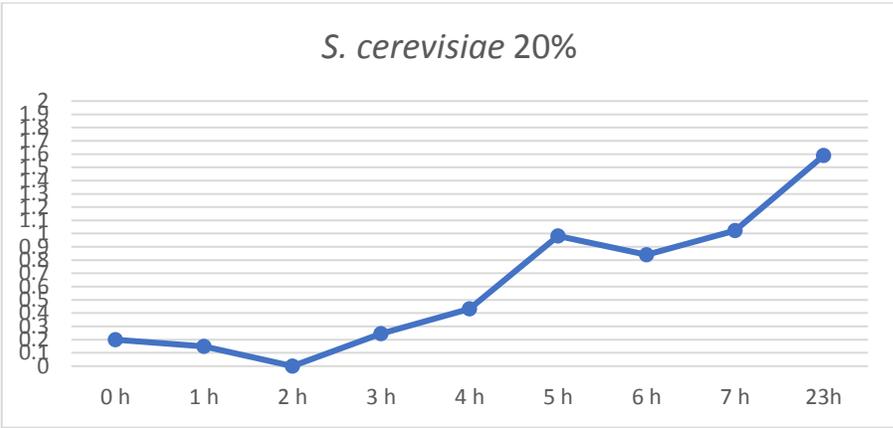
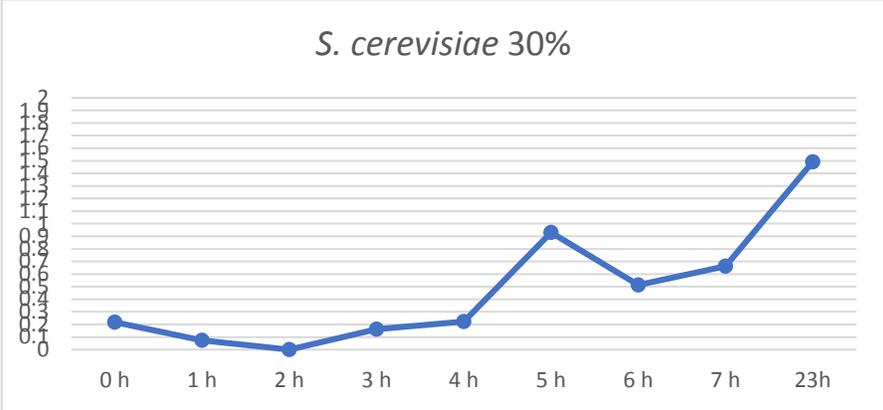


Determinación de Tolerancia a Sacarosa al 10-20-30 % en Levaduras
Saccharomyces cerevisiae y *S. boulardii*

<i>S. cerevisiae</i> L/25-7-12 30%				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,218	0,218	0	0
	0,218			
	0,218			
1 h	0,07	0,073	0,00458258	0,00132288
	0,079			
	0,076			
2 h		-	-	-
3 h	0,175	0,1625	0,0322542	0,00931099
	0,111			
	0,15			
4 h	0,228	0,2215	0,031	0,00894893
	0,274			
	0,215			
5 h	0,895	0,9305	0,3054674	0,08818084
	0,405			
	0,966			
6 h	0,52	0,5135	0,00650641	0,00187824
	0,514			
	0,507			
7 h	0,634	0,663	0,04215843	0,01217009
	0,61			
	0,692			
23h	1,672	1,491	0,1961666	0,05662842
	1,36			
	1,31			

<i>S. cerevisiae</i> L/25-7-12 20%				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	0
	0,2			
	0,2			
1 h	0,151	0,1495	0,00212132	0,00061237
	0,155			
	0,148			
2 h		-	-	-
3 h	0,228	0,2445	0,02333452	0,0067361
	0,272			
	0,261			
4 h	0,425	0,4325	0,0106066	0,00306186
	0,438			
	0,44			
5 h	1,115	0,9815	0,18879751	0,05450115
	0,723			
	0,848			
6 h	0,834	0,841	0,00989949	0,00285774
	0,856			
	0,848			
7 h	0,995	1,023	0,03959798	0,01143095
	0,991			
	1,051			
23h	1,629	1,5885	0,04174127	0,01204967
	1,571			
	1,548			

<i>S. cerevisiae</i> L/25-7-12 10%				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	
	0,2			
	0,2			
1 h	0,291	0,262	0,04101219	
	0,241			
	0,233			
2 h		-!	-	
3 h	0,503	0,453	0,07071068	
	0,491			
	0,403			
4 h	0,71	0,7	0,01414214	
	0,72			
	0,69			
5 h	1,012	0,984	0,03959798	
	1,092			
	0,956			
6 h	1,097	1,0965	0,00070711	
	1,025			
	1,096			
7 h	1,266	1,245	0,02969848	
	1,261			
	1,224			
23h	1,727	1,7685	0,05350701	
	1,71			
	1,81			

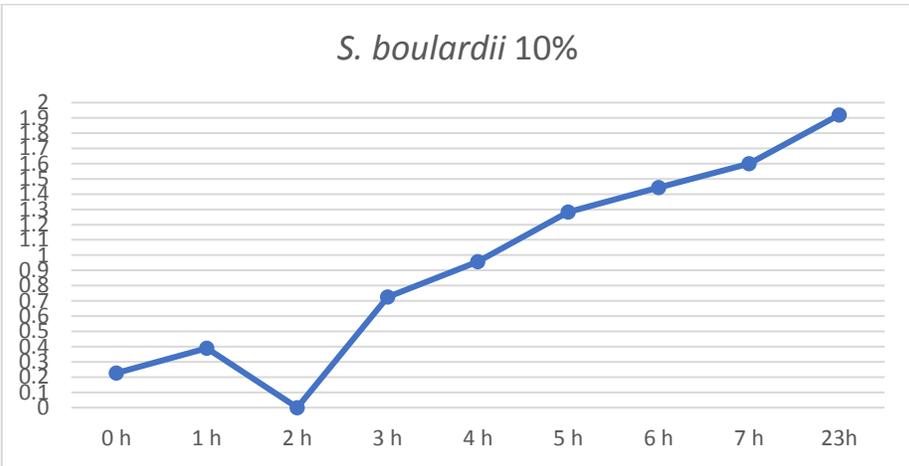
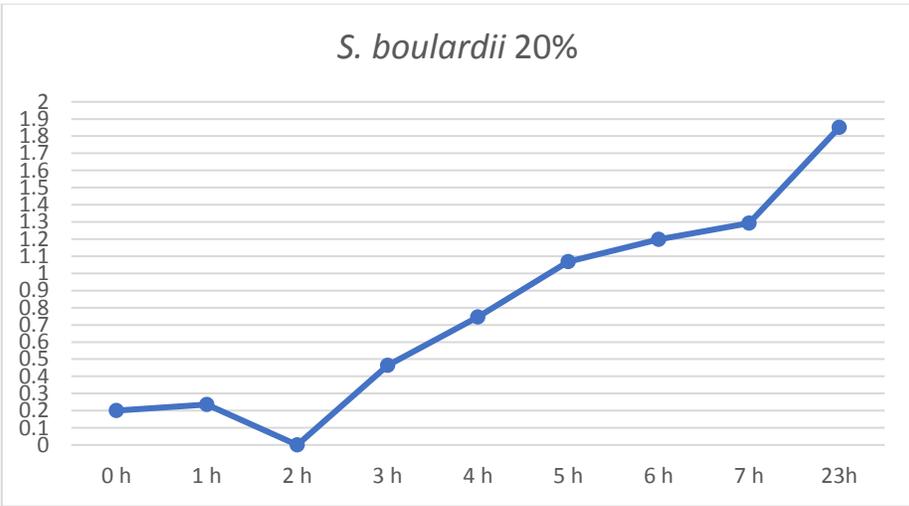
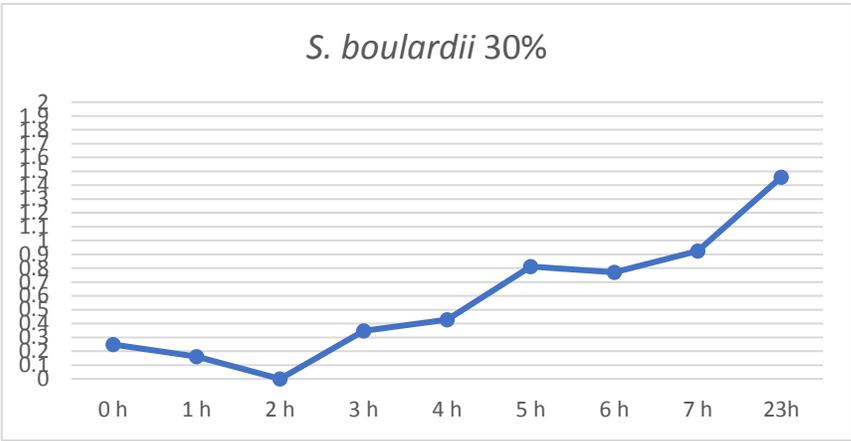


Determinación de Tolerancia a Sacarosa al 10-20-30 % en Levaduras
Saccharomyces cerevisiae y *S. boulardii*

<i>S. boulardii</i> 30%				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,249	0,249	0	0
	0,249			
	0,249			
1 h	0,159	0,161	0,00776745	0,00224227
	0,148			
	0,163			
2 h		-	-	-
3 h	0,332	0,3475	0,03000556	0,00866186
	0,392			
	0,363			
4 h	0,423	0,428	0,0072111	0,00208167
	0,437			
	0,433			
5 h	1	0,8125	0,21621825	0,06241683
	0,626			
	0,625			
6 h	0,781	0,7715	0,00971253	0,00280377
	0,775			
	0,762			
7 h	0,929	0,9255	0,01457166	0,00420648
	0,901			
	0,922			
23h	1,501	1,459	0,09781104	0,02823562
	1,612			
	1,417			

<i>S. boulardii</i> 20%				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	0
	0,2			
	0,2			
1 h	0,236	0,2365	0,00070711	0,00020412
	0,252			
	0,237			
2 h		-	-	-
3 h	0,46	0,464	0,00565685	0,00163299
	0,478			
	0,468			
4 h	0,769	0,7455	0,03323402	0,00959383
	0,766			
	0,722			
5 h	1,091	1,0675	0,03323402	0,00959383
	1,041			
	1,044			
6 h	1,202	1,1975	0,00636396	0,00183712
	1,151			
	1,193			
7 h	1,297	1,2925	0,00636396	0,00183712
	1,328			
	1,288			
23h	1,766	1,851	0,13159407	0,03798794
	1,677			
	1,936			

<i>S. boulardii</i> 10%				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,226	0,226	0	-
	0,226			
	0,226			
1 h	0,427	0,3895	0,05303301	-
	0,33			
	0,352			
2 h		-	-	-
3 h	0,653	0,7245	0,10111627	-
	0,991			
	0,796			
4 h	0,987	0,956	0,04384062	-
	0,937			
	0,925			
5 h	1,309	1,282	0,03818377	-
	1,307			
	1,255			
6 h	1,453	1,444	0,01272792	-
	1,405			
	1,435			
7 h	1,645	1,6	0,06363961	-
	1,469			
	1,555			
23h	1,847	1,92	0,07373602	-
	1,902			
	1,993			



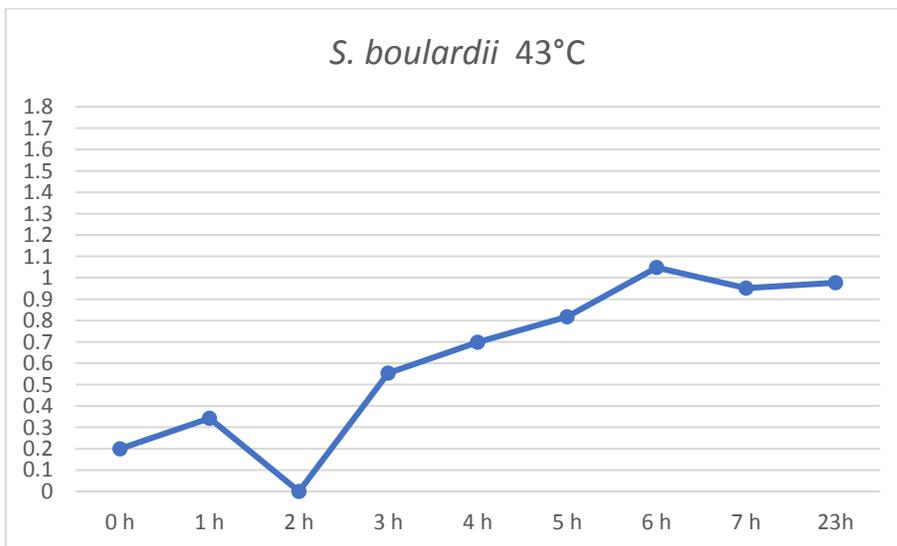
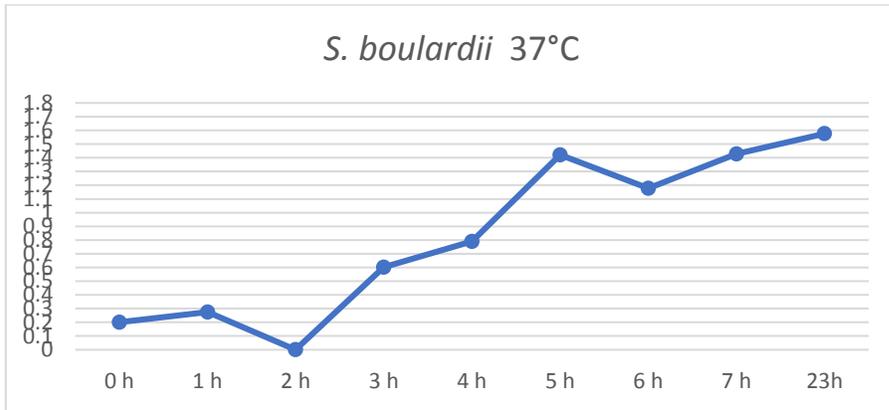
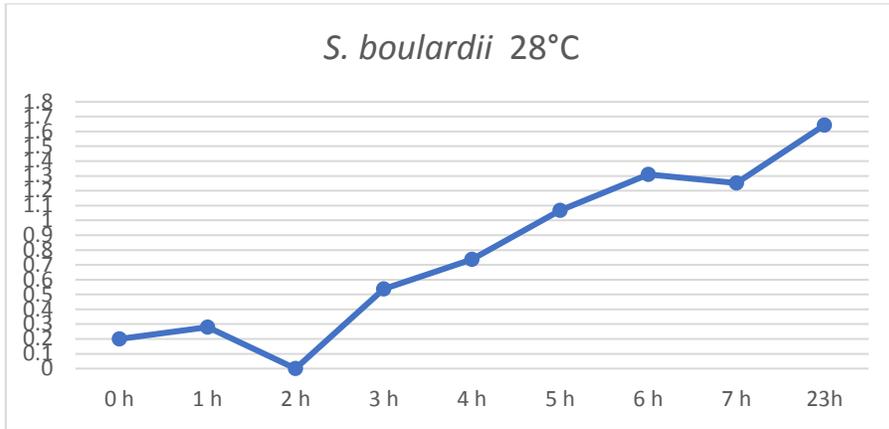
**Crecimiento a diferentes temperaturas 28-37-43°C en Levaduras
Saccharomyces cerevisiae y *S. boulardii***

<i>S. boulardii</i> 28°C				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	3,3993E-17	9,8131E-18
	0,2			
	0,2			
1 h	0,285	0,279	0,02274496	0,00656591
	0,317			
	0,273			
2 h		-	-	-
3 h	0,53	0,538	0,02829016	0,00816667
	0,585			
	0,546			
4 h	0,742	0,7365	0,00585947	0,00169148
	0,74			
	0,731			
5 h	1,062	1,0675	0,02066398	0,00596518
	1,033			
	1,073			
6 h	1,453	1,309	0,16429344	0,04742743
	1,172			
	1,165			
7 h	1,18	1,252	0,08554141	0,02469368
	1,332			
	1,324			
23h	1,672	1,6435	0,03181719	0,00918483
	1,619			
	1,615			

<i>S. boulardii</i> 37°C				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	0
	0,2			
	0,2			
1 h	0,206	0,274	0,09616652	0,02776088
	0,306			
	0,342			
2 h		-	-	-
3 h	0,486	0,603	0,16546299	0,04776505
	0,719			
	0,72			
4 h	0,814	0,7895	0,03464823	0,01000208
	0,762			
	0,765			
5 h	1,403	1,4205	0,02474874	0,00714435
	1,422			
	1,438			
6 h	1,169	1,1785	0,01343503	0,00387836
	1,176			
	1,188			
7 h	1,355	1,4285	0,1039447	0,03000625
	1,502			
	1,502			
23h	1,604	1,576	0,02821347	0,00814453
	1,582			
	1,548			

<i>S. boulardii</i> 43°C				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	
	0,2			
	0,2			
1 h	0,333	0,343	0,01414214	
	0,326			
	0,353			
2 h		-	-	
3 h	0,545	0,5535	0,01202082	
	0,57			
	0,562			
4 h	0,705	0,698	0,00989949	
	0,765			
	0,691			
5 h	0,808	0,818	0,01414214	
	0,82			
	0,828			
6 h	1,049	1,0475	0,00212132	
	1,183			
	1,046			
7 h	0,922	0,952	0,04242641	
	0,973			
	0,982			
23h	0,956	0,977	0,02119748	
	0,972			
	0,998			

\

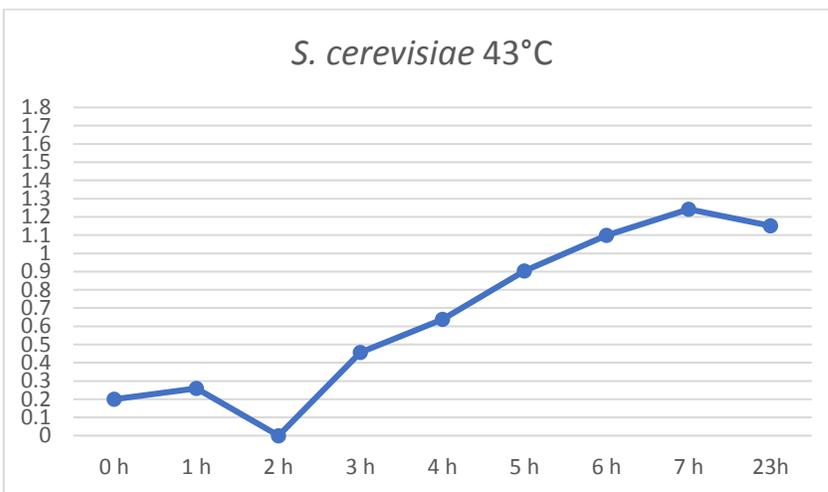
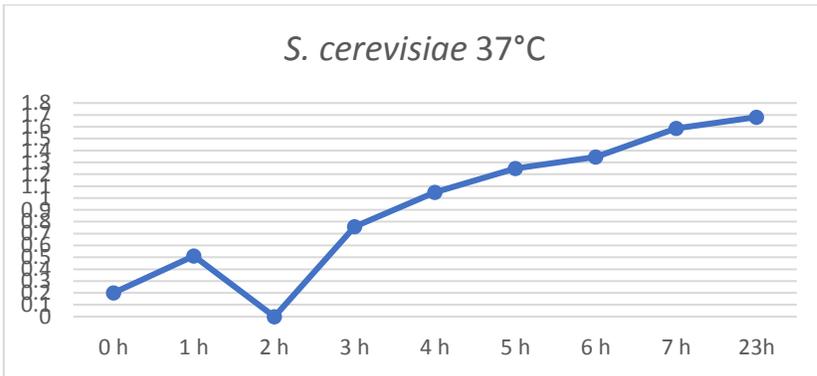
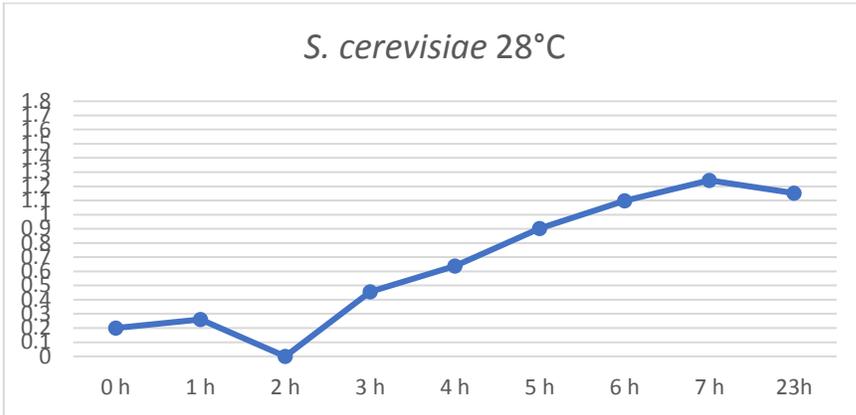


**Crecimiento a diferentes temperaturas 28-37-43°C en Levaduras
Saccharomyces cerevisiae y *S. boulardii***

<i>S. cerevisiae</i> 28°C				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	3,3993E-17	9,8131E-18
	0,2			
	0,2			
1 h	0,259	0,26	0,00416333	0,00120185
	0,253			
	0,261			
2 h		-	-	-
3 h	0,457	0,4565	0,00152753	0,00044096
	0,459			
	0,456			
4 h	0,647	0,6385	0,01193035	0,003444
	0,624			
	0,63			
5 h	0,91	0,9025	0,03629049	0,01047616
	0,964			
	0,895			
6 h	1,122	1,099	0,07354817	0,02123153
	1,22			
	1,076			
7 h	1,229	1,242	0,03592121	0,01036956
	1,3			
	1,255			
23h	1,151	1,151	0	0
	1,151			
	1,151			

<i>S. cerevisiae</i> 37°C				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	0
	0,2			
	0,2			
1 h	0,73	0,512	0,30829856	0,08899813
	0,305			
	0,294			
2 h		-	-	-
3 h	0,964	0,7575	0,2920351	0,08430327
	0,539			
	0,551			
4 h	1,133	1,049	0,11879394	0,03429286
	0,953			
	0,965			
5 h	1,282	1,25	0,04525483	0,01306395
	1,224			
	1,218			
6 h	1,27	1,3465	0,10818734	0,03123099
	1,482			
	1,423			
7 h	1,639	1,5865	0,07424621	0,02143304
	1,517			
	1,534			
23h	1,805	1,6815	0,13478254	0,03890837
	1,588			
	1,558			

<i>S. cerevisiae</i> 43°C				
Tiempo	Abs	Prom. Abs	Desv. Estan	Error Estan
0 h	0,2	0,2	0	
	0,2			
	0,2			
1 h	0,297	0,302	0,00707107	
	0,303			
	0,307			
2 h		#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	
3 h	0,659	0,6575	0,00212132	
	0,674			
	0,656			
4 h	0,772	0,7785	0,00919239	
	0,719			
	0,785			
5 h	0,996	0,9825	0,01909188	
	0,962			
	0,969			
6 h	0,944	1,016	0,10182338	
	1,091			
	1,088			
7 h	1,358	1,2885	0,09828784	
	1,158			
	1,219			
23h	1,257	1,278	0,03340659	
	1,233			
	1,299			



Laboratorio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.Mexico





Grupo de trabajo ICIDCA-IPN



Coordinadores del Proyecto por parte del ICIDCA y el IPN



Colectivo de trabajo IPN- ICIDCA

ACTIVIDAD 04

Resultados del adiestramiento de la licenciada Dacelis Borroto Mato.

El adiestramiento se realizó en un Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrometría de Masas

Marca Agilent 7890A

Inyector Manual

Columna DB5 medianamente polar

Temperatura: Se empezó con 40 °c y luego se aumentó hasta 310°c.

Tiempo de duración de las corridas para garantizar que salgan todos los compuestos a identificar fue de 40 min.

Tabla 1. Muestras a Analizar.

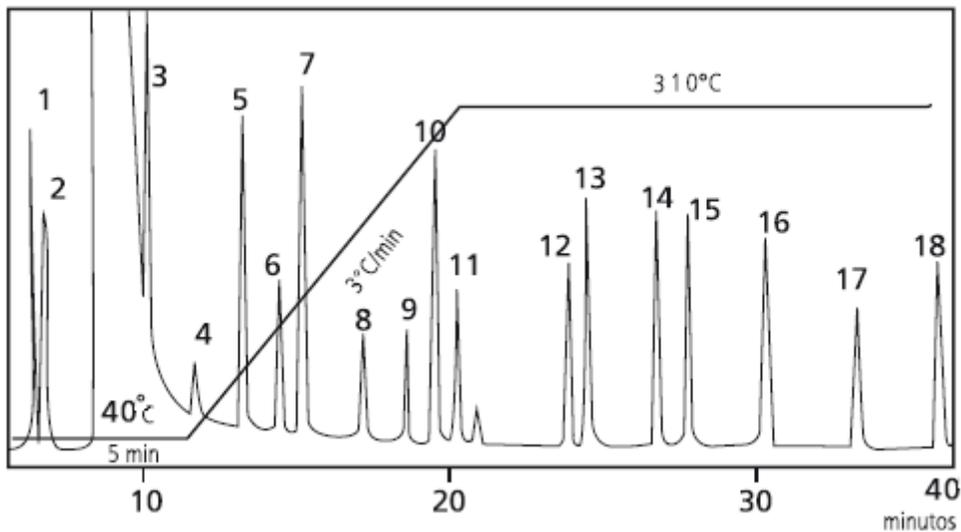
Número de Tonel	Rango de edades	Edad real de la muestra
170	4.0-4.5	4.24
227	5.0-5.5	4.46
230	5.0-5.5	5.46
221	6.0-6.5	6.35
222	6.0-6.5	6.38

Como ya teníamos las muestras seleccionadas y las condiciones cromatográficas necesarias, comenzamos con las corridas. Para ello corrimos primero un blanco para cerciorarnos de que en la columna no quedara ningún otro compuesto que pueda interferir en nuestras corridas y variarnos los resultados. Luego inyectamos la primera muestra (221) para ver que tal salía el cromatograma y que compuestos se podían identificar y se inyectaron el resto de las muestras manteniendo las mismas condiciones en el equipo.

Concluidas las corridas comenzamos a procesar los resultados obtenidos usando el software y la biblioteca con que cuenta el cromatografo. Se determinó que dado el poco tiempo con que se contaba solo se podía realizar la identificación de los compuestos según sus tiempos de retención ya que una cuantificación por parte de las muestras requiere del empleo de patrones con los que no se contaban y la realización de curvas de calibración lo que complejizaba más el trabajo.

Se realizó una reunión de conclusiones donde nos entregaron los resultados los cuales fueron analizados y discutidos (ver figura 1).

Figura 1. Cromatograma de congéneres



Se comparó el resultado con el trabajo realizado con el panel sensorial, donde a cada catador se le pidió que generaran descriptores aromáticos capaces de diferenciar entre las muestras de aguardiente, en el perfil aromático de OLOR y SABOR. Estos fueron los descriptores identificados: roble, vainilla, coco, cedro, clavo, especia, herbáceo, caramelo, frutal, etanol, aldehídico, dulzor, fúsel oil. Los cuales están relacionados con los compuestos detectados por cromatografía de gases acoplados a masas: Ácido gálico(12), ácido vainílico(13), ácido siríngico(14), ácido p-hidroxibenzaldehído(15) ácido p-cumárico(16), ácido ferúlico(17), ácido protocatequico(18). El resto son otros compuestos presentes en el aguardiente. Dado que las muestras no recibieron ningún tratamiento solo se pudieron identificar algunos ácidos presentes.

Con estos resultados se puede comparar el trabajo hecho en el panel sensorial y de esta manera tendremos caracterizada nuestra solera y valorar los compuestos que tenemos presentes en nuestras bases para la formulación de nuevos productos y perfeccionar los que se producen en la actualidad.

Estancia en la UNAM de joven Investigadora del ICIDCA.



Entrenamiento en el Cromatógrafo de gases acoplado a masa en la UNAM



Grupo de trabajo del convenio con la UNAM

III. LECCIONES APRENDIDAS

- i. Debe establecerse una estrecha coordinación de las tareas comprometidas con el PNUD, con la Entidad Nacional de Ejecución (ICIDCA) y organismos superiores al que se adscribe (Grupo Empresarial AZCUBA). Esto garantizará una correcta disponibilidad de recursos logísticos como la eficiente importación de bienes y servicios, transportación interna, dietas, etc., así como la redistribución de recursos ante situaciones de riesgo.
- ii. Deben explorarse y ser puestas en acción estrategias alternativas ante situaciones de riesgo para una ejecución exitosa dentro del cronograma establecido como medios de comunicación más versátiles y económicos, protocolos de investigación con equipamientos y material gastable de fácil adquisición.
- iii. Los resultados obtenidos deben ser divulgados de forma sistemática no solo con la comunidad científica a través de artículos técnicos en revistas especializadas, sino también a beneficiarios de los resultados (productores, empresas locales, etc.), para su correcta implementación.

IV. INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE

IV.1. Resumen de la situación financiera (USD).

Nombre del Proyecto	Presupuesto Total	Ejecución acumulada	Ejecución pendiente	% de ejecución
Proyecto "Levaduras de destilería: Criterios de calidad para la producción de etanol y alimento animal"	32,000.00	28 800,00	3 200.00	100,00