



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

Estandarización del Proceso de Fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*

MEMORIA DE PRÁCTICAS PROFESIONALES

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

DIANA LÓPEZ PADILLA

Hermosillo, Sonora

Diciembre del 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor, fortaleza, fidelidad y por darme una familia que siempre me apoya en todo lo que necesito, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Miguel Angel y Teresita, por darme amor, apoyo, confianza y el gran ejemplo de seguir adelante en todas las etapas de mi vida.
Gracias por estar siempre conmigo, los amo de todo corazón.

A mis hermanos, Georgina, Edith y Eliud, porque han sido mi ejemplo a seguir durante toda mi vida y su amistad siempre ha estado ahí para aconsejarme y escucharme.

A Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V. por permitirme realizar las practicas profesionales en sus instalaciones y a todo el personal del Laboratorio de Investigaciones en Bioactivos y Alimentos Funcionales (LIBAF) por compartir su conocimiento y amistad.

A mi director de memoria de prácticas, Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia, por darme la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento. Le agradezco el tiempo y la enorme paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado de la propuesta de Titulación por la opción de prácticas profesionales, Dra. María Teresa Certucha Barragán, Dra. Onofre Monge Amaya y Dra. Guadalupe López Avilés por su apoyo y disposición para la culminación de este trabajo.

A todos los que forman parte del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia (DIQM), profesores, por brindarme sus conocimientos, apoyo e inspiración para seguir adelante día a día y personal administrativo, por brindarme las facilidades en todos los tramites.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 Justificación	3
I.2 Objetivo General.....	4
I.2.1 Objetivos Particulares	4
I.3 Fundamento teórico de los conocimientos aplicados.....	5
II. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO	7
II.1 Descripción del área de trabajo donde se realizaron las prácticas profesionales	7
II.2 Equipamiento e instalaciones donde se desarrollaron las actividades que integra el programa de prácticas profesionales	9
II.3 Descripción de la normatividad o reglas de operación.....	14
III. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	15
III.1 Preparación de medios de cultivo	15
III.1.1 Procedimiento de preinoculación e inoculación.....	15
III.2 Evaluación de cinética de crecimiento	16
III.3 Diseño de experimento factorial	17
III.3.1 Determinación de azúcares totales por el método de antrona	18
III.3.2 Determinación de azúcares reductores por el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	18
III.3.3 Análisis de pH	18
III.3.4 Evaluación de densidad óptica y recuento de levaduras.....	19
III.3.5 Determinación de grados Brix	19
III.3.6 Determinación de acidez titulable.....	19
III.4 Descripción de los problemas atendidos y propuestas de solución	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
IV.1 Evaluación de cinética de crecimiento.....	21
IV.2 Evaluación del diseño experimental	22

IV.2.1 Azúcares totales por el método de antrona.....	22
IV.2.2 Azúcares reductores por el método de DNS.....	24
IV.2.3 Análisis de pH.....	26
IV.2.4 Grados Brix.....	26
IV.2.5 Producción de ácido cítrico.....	29
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	30
V.1 Conclusiones.....	30
V.2 Recomendaciones.....	30
VI. ANALISIS DE LA EXPERIENCIA ADQUIRIDA.....	31
VI.1 Análisis general del programa, su diseño, desarrollo y organización ..	31
VI.2 Análisis de los objetivos del programa y grado de consecución.....	32
VI.3 Análisis de las actividades realizadas	33
VI.4 Análisis de la metodología utilizada.....	34
VII. CONCLUSIONES DE LA EXPERIENCIA ADQUIRIDA.....	35
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación Rubio Pharma.....	7
Figura 2. Espectrofotómetro para microplacas.....	9
Figura 3. Refractómetro digital	10
Figura 4. Espectrofotómetro UV-Vis.....	11
Figura 5. Microscopio óptico.....	12
Figura 6. Agitador Vortex	12
Figura 7. Medidor de pH.....	13
Figura 8. Material de laboratorio.....	13
Figura 9. Comparación de la densidad óptica en medios de cultivo.....	21
Figura 10. Comportamiento de azúcares totales bajo las condiciones de la matriz de experimentos.....	23
Figura 11. Comportamiento de azúcares reductores bajo las condiciones de la matriz de experimentos	24
Figura 12. Comportamiento del pH	26
Figura 13. Comportamiento de grados Brix.....	27
Figura 14. Consumo de grados Brix.....	28
Figura 15. Producción de ácido cítrico	29

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Matriz de experimentos	17
Tabla 2. Datos de cinética de crecimiento en diferentes medios de cultivo	22
Tabla 3. Consumo promedio de azúcares totales por el método de antrona	23
Tabla 4. Consumo promedio de azúcares reductores.....	25
Tabla 5. Eficiencia en el consumo de sólidos solubles.....	28

I. INTRODUCCIÓN

Las prácticas profesionales son de carácter indispensable para completar con el plan de estudios de todas las licenciaturas de la Universidad de Sonora. Estas nos dan una orientación para desarrollarnos en el ámbito laboral, donde nos enfrentaremos con situaciones reales, las cuales nos permiten reforzar los conocimientos y habilidades adquiridas en el aula.

Las prácticas profesionales, las realice en la empresa Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V., la cual se dedica a ofrecer medicamentos y servicios que aumenten la calidad de vida de la sociedad, estos se realizan por medio de investigación y desarrollo de nuevos productos los cuales se convierten en alternativas positivas para mejorar la salud.

La estandarización del proceso de fermentación de una bebida nutraceútica es parte de la investigación y desarrollo de nuevos productos ya que a partir de este proceso se obtiene un producto original el cual tiene gran beneficio a la salud.

I.1 Justificación

El desarrollo de una bebida nutraceútica fermentada que se prepara de manera artesanal y sobre esta se ha podido demostrar actividad biológica y mejoras en los índices de calidad de los pacientes suplementados. Requiere del desarrollo del procesamiento de la materia prima hasta el manejo y control de las variables involucradas en el proceso de fermentación para estandarizar el producto deseado.

Sin embargo, existen numerosas variantes tecnológicas para su preparación y conservación, entre ellas la fermentación que puede incidir en la preparación de sus compuestos activos y por lo tanto potencializar su actividad biológica. De ahí la necesidad de tener un proceso de fermentación controlado y estandarizado con el fin de mantener las condiciones óptimas del proceso.

I.2 Objetivo General

Estandarizar el proceso de fermentación con levadura *Saccharomyces cerevisiae* a partir de la evaluación y caracterización de medios de cultivo.

I.2.1 Objetivos Particulares

- Evaluar diferentes medios de cultivo para el estudio cinético con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Evaluar el efecto de la concentración de azúcar, pH y nitrógeno en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

I.3 Fundamento teórico de los conocimientos aplicados

En México, como producto de una cultura milenaria, las plantas medicinales constituyen un recurso natural sumamente valioso y son utilizadas por más del 80% de los habitantes de las zonas rurales del país. Por otro lado, existe un interés creciente a nivel mundial por desarrollar fitofármacos y nutraceuticos con contenidos químicos estandarizados y con un alto valor terapéutico (Lewis et al., 2014).

Desde el 2007 en el laboratorio de investigaciones en bioactivos y alimentos funcionales (LIBAF) de la empresa Rubio Pharma y Asociados se ha estado investigando sobre la composición nutricional, fenólica y actividad biológica de *Morinda citrifolia* (noni) cosechado en Tepic, Nayarit (Lewis et al., 2014)

Al evaluar la capacidad antioxidante de este fruto se ha podido comprobar los beneficios para la salud que ofrece como la capacidad antiinflamatoria y de protección de la mucosa gástrica. Por lo que, surge la idea de desarrollar el producto de una bebida nutraceutica fermentada con el fin de ofrecer todos estos beneficios del fruto (Iloki et al., 2013).

La Asociación Americana de Nutraceuticos utiliza la definición establecida por De Felice: "Un nutraceutico es producto de origen natural con propiedades biológicas activas proporciona beneficios médicos o de salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades. Estos productos pueden abarcar desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y dietas específicas, hasta alimentos de diseño de ingeniería genética" (González et al., 2013).

La fermentación no solo consiste en dejar la fruta en un depósito de fermentación, sino que su proceso va más allá de una simple realización mecánica, por lo que es indispensable tener un proceso controlado y estandarizado con el fin de mantener las condiciones óptimas, donde esta se define como un proceso biológico en el cuál algunos microorganismos que, en condiciones anaerobias, procesan la glucosa, fructuosa, sacarosa, etc. (Puerta, 2010).

Existen diferentes tipos de fermentación, entre ellas, alcohólica, acética, láctica y butírica. Para el desarrollo de esta investigación se utiliza la fermentación alcohólica la cual es realizada principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que en condiciones de anaerobiosis procesan azúcares, como la glucosa para así producir un alcohol en forma de etanol y $\text{CO}_2(\text{g})$ (Puerta, 2010).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. El cultivo y fermentación de la levadura requiere de condiciones ambientales óptimas, de una variedad de nutrientes esenciales y vitaminas. Los nutrientes existentes en los medios de cultivo dan a las levaduras todos los requerimientos para que se reproduzcan y/o fermenten (Puerta, 2010).

Estas levaduras tienen una gran aplicación en diversos procesos fermentativos, además de que en el mercado se pueden encontrar una diversidad de productos funcionales con aporte de vitaminas, proteínas y minerales elaborados a partir de levadura (Suárez et al., 2016).

Por lo tanto, es necesario realizar un diseño de medio de cultivo para la fermentación que genere las mejores garantías de crecimiento, el mejor desarrollo para el microorganismo y el máximo rendimiento de producción. El medio debe de satisfacer los requerimientos nutricionales y ambientales para la levadura.

Todos estos factores favorecen a una buena fermentación, por lo que, es importante mantener las mejores condiciones para poder obtener la estandarización del proceso de fermentación de la levadura.

II. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

II.1 Descripción del área de trabajo donde se realizaron las prácticas profesionales

Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V. es una empresa farmacéutica mexicana fundada en 1992 en Hermosillo, Sonora, México.

Esta empresa se encarga de distribuir en el territorio mexicano los medicamentos del grupo Ergo-Pharm Alemania Heel; cuenta con puntos de venta en lugares estratégicos en el centro, sur y norte de México, teniendo así la red más amplia de distribución a lo largo del país. En la Figura 1 se muestra la ubicación de las oficinas y laboratorios de esta empresa, localizada en el Blvd. Jesús García Morales No. 300, colonia Montebello, al oeste de la ciudad de Hermosillo.

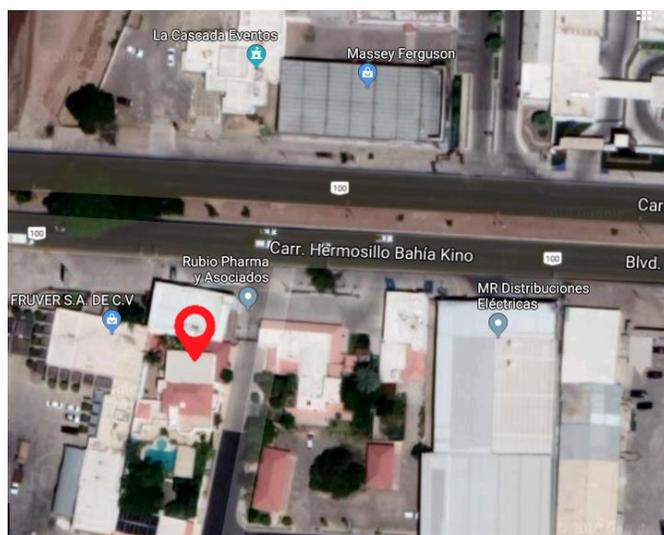


Figura 1. Ubicación Rubio Pharma

Una de las principales responsabilidades de esta empresa es ofrecer medicamentos y servicios que aumenten la calidad de vida de la sociedad, por lo que cuenta con productos registrados ante la Secretaría de Salud, ofreciendo así la seguridad de

ser productos confiables y de acción eficaz. Por todo lo anterior, Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V. representa una alternativa real en salud y brinda la oportunidad al profesional médico de conocer esta rama de la medicina.

El carácter visionario de esta empresa ha instalado un laboratorio de investigación con equipos de primer mundo, el cual trabaja en desarrollar alternativas para mejorar la salud, las áreas en que está dividida la empresa son:

- Núcleo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (NICDET).
- RD Research & Technology S.A. de C.V.
- Laboratorio de Investigaciones en Bioactivos y Alimentos Funcionales (LIBAF).

El Laboratorio de Investigaciones en Bioactivos y Alimentos Funcionales (LIBAF), donde desarrollé las prácticas profesionales se especializa en investigación básica a partir de fuentes naturales, participa activamente en la identificación de compuestos claves para el desarrollo a futuro de diferentes medicamentos y suplementos.

II.2 Equipamiento e instalaciones donde se desarrollaron las actividades que integra el programa de prácticas profesionales

Con el fin de llevar a cabo el trabajo de investigación y experimentación para la estandarización del proceso de fermentación, se utilizaron diferentes equipos y materiales de laboratorio.

Espectrofotómetro para microplacas. En la Figura 2 se muestra el equipo que se utilizó un equipo de la marca (Thermo Fisher Scientific) el cual se usa para medir absorbancia en microplacas de 6 a 384 pocillos. Está diseñado para una amplia gama de aplicaciones fotométricas, como análisis de ácidos nucleicos y proteínas, ensayos enzimáticos y citotoxicidad, así como ensayos de proliferación celular. También tiene capacidades de incubación y agitación. Mediante el uso de este equipo se pudo realizar curvas de calibración, y monitorear diferentes parámetros referentes a la estandarización de la fermentación como lo son la medición de azúcares totales y reductores.



Figura 2. Espectrofotómetro para microplacas

Refractómetro digital. En la Figura 3 se muestra este instrumento (Atago, modelo PR-101) mediante el cual se pudo determinar el porcentaje de sólidos solubles en una disolución líquida, mediante el principio de refracción total de la luz (originada por el tipo y la concentración de las sustancias disueltas en una disolución líquida, por ejemplo, el azúcar).

La escala de medición se denomina grados brix (%), esta muestra el porcentaje de concentración de los sólidos solubles contenidos en una muestra (solución de agua). El contenido de los sólidos solubles es el total de todos los sólidos disueltos en el agua, incluso el azúcar, las sales, las proteínas, los ácidos, etc. Por lo que mediante el uso de este instrumento se pudo conocer el contenido de sólidos solubles en las muestras utilizadas para la estandarización del proceso de fermentación.



Figura 3. Refractómetro digital

Espectrofotómetro UV-Vis. En la Figura 4 se muestra este equipo (Hach, Dr 5000). Se utiliza para el análisis de absorción ultravioleta y visible (UV-Vis) mediante la medición de la atenuación de un haz de luz que pasa a través de una muestra o por reflexión desde la superficie de esta. Por medio de este equipo se pudo conocer la absorbancia de los medios de cultivo inoculados con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para así tener control de la cinética de crecimiento y conocer la biomasa presente.



Figura 4. Espectrofotómetro UV-Vis

Microscopio óptico. En la figura 5 se muestra este instrumento (Zeiss, Axiolab.A1) el cual fue de gran utilidad ya que tiene como objetivo principal poder visualizar microorganismos y estructuras no visibles a simple vista. Mediante el uso del microscopio y la cámara de Neubauer la cual es un portaobjetos utilizado para realizar recuento de esporas y células en un medio líquido, se pudo monitorear y hacer recuento de las levaduras presentes en los medios de cultivo inoculados para así conocer la cinética de crecimiento de estas.



Figura 5. Microscopio óptico

Agitador Vortex. En la figura 6 se muestra este instrumento marca (LW Scientific) el cual está diseñado para mezcla de líquidos. Se utiliza para poder agitar pequeños tubos o frascos. Este instrumento se compone de un motor eléctrico con el eje de transmisión orientado verticalmente y unido a un trozo de goma o caucho montado en forma de copa, ligeramente excéntrico. A medida que el motor gira la pieza de caucho oscila rápidamente en un movimiento circular y genera un vórtice.

Cuando un tubo de ensayo o recipiente adecuado se coloca en el soporte de goma (o toca su borde) el movimiento se transmite al líquido en su interior y se crea un vórtice.



Figura 6. Agitador Vortex

Medidor de pH. En la Figura 7 se muestra este instrumento (Orion Star, A211) mediante el cual se midió el pH de todas las disoluciones. La determinación de pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una fina membrana de vidrio que separa dos soluciones con diferente concentración de protones.



Figura 7. Medidor de pH

Materiales e instrumentos de laboratorio. En la Figura 8 se muestran algunos materiales e instrumentos de laboratorio que existen de los cuales cada uno cumple con una función en específico. Estos por lo regular son de: vidrio, porcelana, metal, plástico, madera, etc. Así también, estos materiales permiten realizar con mayor facilidad el trabajo de experimentación. Algunas de las funciones de estos son: medición de volúmenes, calentar, contener, preparar o traspasar líquidos, mezclar soluciones químicas, entre otras. Por ejemplo: probetas, pipetas, buretas, placas de calentamiento, matraces, vasos de precipitados, entre otros.



Figura 8. Material de laboratorio

II.3 Descripción de la normatividad o reglas de operación

Cada una de las tareas que se realizaron en el laboratorio tenían que sujetarse a distintas reglas y normas para atender los procedimientos establecidos por la Secretaría de Salud. Estas a su vez destinadas para proteger al personal, evitar accidentes y contaminación tanto dentro del área de trabajo, como hacia el exterior.

Primeramente, se realizó la ubicación de los elementos de seguridad en el laboratorio, como: extintores, salidas de emergencia, lava ojos, botiquín, alarmas de fuego, entre otros. Esto con el fin de que si llegara a ocurrir algún accidente poder accionar de manera rápida y evitar alguna propagación.

Por otro lado, la vestimenta era un factor importante, como: el uso de bata de laboratorio, zapato cerrado y cabello recogido. Así también, era de suma importancia utilizar guantes apropiados para evitar el contacto directo con sustancias químicas o material biológico.

Así mismo, las mesas de trabajo siempre tenían que estar despejadas, sin libros, ni objetos personales, para poder mantener orden y limpieza en el área.

También, otra regla importante era que no se permitía utilizar equipos o material de laboratorio sin antes haber recibido entrenamiento.

Para poder llevar a cabo la experimentación del trabajo de investigación, tuve que leer previamente los procedimientos normalizados de técnicas establecidas por la empresa, conocer cada una de las normas de seguridad para utilización de los diferentes reactivos y de los residuos que se generaban para cada experimento, para así realizar el trabajo de la mejor manera posible y evitar cualquier complicación.

También, era muy importante siempre tener bien identificados cada una de los recipientes y sustancias a utilizar por ese motivo se tenían que etiquetar para que cualquiera del personal del laboratorio pudiera saber cuál era el contenido de los recipientes y así tomar las medidas necesarias para evitar accidentes.

III. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

III.1 Preparación de medios de cultivo

En este procedimiento se prepararon dos diferentes medios de cultivo, extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés) y azúcar mascabado. En matraces de 125 mL se prepararon por duplicado 50 mL de cada uno de los medios de cultivo con concentraciones de 50 y 150 $\frac{g}{L}$, respectivamente. Después de esto se esterilizaron los matraces en una autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

III.1.1 Procedimiento de preinoculación e inoculación

Para realizar la preinoculación se utilizó un medio de cultivo de YPD y otro de azúcar mascabado, en un ambiente estéril se tomó una asada de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, después se introdujo en el matraz que contenía los 50 mL de medio de cultivo, se agitó para homogenizar y se incubó a 30 °C por 72 horas a 250 rpm.

Para inocular los matraces de medio de cultivo estéril es necesario contar con los preinóculos en fase exponencial, para esto primeramente se determinó la densidad óptica (DO) del preinóculo mediante el uso de un espectrofotómetro de UV/vis (Hach, Dr 5000) a 600 nm para así saber la cantidad que se debe de adicionar al medio de cultivo de YPD y de azúcar mascabado.

Para conocer la cantidad de inóculo a adicionar, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{DO_2}{DO_1} = X$$

Por lo tanto, si 50 mL / X = mL de inóculo

Donde:

- DO_2 . Es la lectura medida de DO del preinóculo a 600 nm
- DO_1 . Es la DO que deseamos para iniciar la cinética en fase exponencial
- X. Es la correlación entre las DO conocidas.

III.2 Evaluación de cinética de crecimiento

Una vez que los medios de cultivo fueron inóculados, cada 2 horas se tomaron 5 mL de muestra la cual se agregó a la celda y se leyó en el espectrofotómetro UV/Vis a 600 nm (Hach, Dr 5000) de esta manera se obtuvo el valor de absorbancia para así poder monitorear la cinética de crecimiento. Por otra parte, se realizó el recuento de levaduras a partir de la cámara de Neubauer, tomando en cuenta cinco campos de la cámara. Los matraces se mantuvieron en incubación a 30 °C y en agitación constante a 250 rpm durante 166 horas. Mediante la siguiente ecuación se determinaron el número de levaduras presentes durante cada una de las muestras tomadas.

$$\text{Millones de células por mililitro} = \left(\left(\frac{\text{No. de levaduras contadas}}{5} \right) * 2.5 \times 10^5 \right) * \text{factor de dilucion}$$

III.3 Diseño de experimento factorial

Para este procedimiento se tomó como aspecto fundamental para llevar a cabo una buena fermentación el trabajar con las variables de: concentración de azúcar en g/L, pH o acidez del medio y concentración de nitrógeno en g/L. Cada experimento se realizó a partir de 100 mL de medio de cultivo inóculado donde cada 2 horas se tomó muestra para realizar los análisis de determinación de azúcares totales, azúcares reductores, pH, densidad óptica, recuento de levaduras, acidez titulable y grados Brix esto por un periodo de 298 horas.

En la Tabla 1 se muestra la matriz de diseño, donde se puede observar que se utilizaron dos rangos de concentración uno alto y otro bajo.

Tabla 1. Matriz de experimentos

No. Experimento	Azúcar Mascabado (g/L)	pH	Nitrógeno (g/L)
1	100	4.0	0.11
2	100	7.0	0.11
3	100	4.0	0.22
4	100	7.0	0.22
5	200	4.0	0.11
6	200	7.0	0.11
7	200	4.0	0.22
8	200	7.0	0.22

III.3.1 Determinación de azúcares totales por el método de antrona

Para realizar este procedimiento se adicionó 1 mL de muestra en un tubo de ensayo, después se agregó 5 mL de solución de antrona lentamente, ya que es una reacción exotérmica, posteriormente se agitó en un Vortex (LW Scientific) y luego se llevó a ebullición en baño María durante 10 minutos (teniendo cuidado de que no se abran los tubos debido a que es un medio ácido), después se pasaron los tubos a enfriar en hielo esto con la finalidad de detener la reacción, una vez que se enfriaron las muestras se retiró el hielo y se dejó reposar hasta alcanzar temperatura ambiente. Cuando las muestras ya estaban a temperatura ambiente se leyeron a 650 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific).

III.3.2 Determinación de azúcares reductores por el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para llevar a cabo este análisis, primeramente se tomó 1 mL de muestra y se colocó en un tubo de ensayo, posteriormente se agregaron 200 μ L del reactivo DNS, después se colocaron las muestras a ebullición a 100 °C en baño María durante 5 minutos, se dejaron enfriar y se le añadieron 2 mL de agua destilada fría, se dejó llevar a cabo la reacción durante un periodo de 5 a 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se leyó en un espectrofotómetro UV/Vis (Hach, Dr 5000) a 450 nm.

III.3.3 Análisis de pH

Para medir el pH de las muestras, primero se agregaron aproximadamente 6 mL de muestra en un vaso de precipitado de 10 mL, luego se sumergió el electrodo del medidor de pH (Orion Star, A211), después se dio clic en medir y se esperó a que se estabilizara para tomar la medición. El pH ideal para las levaduras es entre 4.0 y 5.0 (Mato 2005; Lamikarra 1997).

III.3.4 Evaluación de densidad óptica y recuento de levaduras

Para realizar esta evaluación se utilizaron 5 mL de cada una de las muestras de los experimentos, se agregaron a la celda y se leyeron en un espectrofotómetro UV/Vis (Hach, Dr 5000) a 600 nm.

El recuento de levaduras se llevó a cabo mediante la cámara de Neubauer, donde primero se cubrió la cámara con un cubreobjetos que el cual se adhiere por tensión superficial, luego por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos se agregaron 10 μ L de muestra a contar; la cámara tiene dos zonas lo que permite hacer dos recuentos simultáneamente, después se colocó la cámara en el microscopio óptico y se puso el objetivo de 40x, se enfocó y se comenzó hacer el conteo.

III.3.5 Determinación de grados Brix

Este análisis se realizó mediante un refractómetro digital (Atago, modelo PR-101), se agregaron unas cuantas gotas de agua destilada a la celda y se dio clic en calibrar, posteriormente se limpió la celda, después se colocaron unas cuantas gotas de muestra y se le dio clic en medir. De esta manera se obtuvieron los valores de grados Brix de las muestras (NMX-F-103-1982).

III.3.6 Determinación de acidez titulable

Para llevar a cabo este análisis primeramente en un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 mL de muestra, posteriormente se añadieron 2 gotas de fenolftaleína en solución y se agitó. Después, la muestra se tituló con una solución de NaOH 1N y se llevó el registro de los mL gastados

Mediante la siguiente formula se reportaron los datos de acidez total:

$$\text{Acido cítrico } \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}} = \left(\text{ml NaOH} * N \text{ NaOH} * \frac{67}{100\text{mL}} * 1\text{mL} \right) * 100$$

III.4 Descripción de los problemas atendidos y propuestas de solución

El principal problema que se presentó fue que durante la experimentación el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no era constante debido a que la incubadora con agitación se descompuso y esto causó la desestabilización de las condiciones óptimas para el desarrollo de la levadura; por lo que se tuvieron que repetir los experimentos para así obtener buenos resultados.

Se presentó el problema de baja producción de alcohol esto debido a que los experimentos montados necesitan estar sin presencia de oxígeno para que las levaduras pudieran producir alcohol, pero debido a que se les realizaba diferentes análisis fisicoquímicos era necesario abrirlos y extraer la muestra, por lo que, esto provocaba la entrada de oxígeno y que se diera un pequeño desajuste en la fermentación. Por este motivo se propuso como solución el sellar bien los matraces Erlenmeyer y hacer la toma de muestra de manera más rápida.

Otro de los problemas que se presentó fue que durante la evaluación de los experimentos para realizar el análisis de azúcares totales por el método de antrona, se realizaba la preparación del reactivo en gran cantidad y se almacenaba en el refrigerador el resto no utilizado, debido a que el reactivo es muy inestable se propuso que se preparara solo la cantidad necesaria para las muestras del día para que de esta manera el reactivo siempre estuviera estable.

Todos y cada uno de los problemas y situaciones que surgieron durante la realización de las prácticas profesionales, me sirvieron para poder razonar ante las situaciones y así también el poder pensar para poder dar una solución y poder continuar con el trabajo de investigación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Evaluación de cinética de crecimiento

En la Figura 9 se muestra el comportamiento de la densidad óptica después de haber realizado la inoculación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en los medios de cultivo YPD y azúcar mascabado, estos se mantuvieron en incubación a 30 °C y en agitación constante a 250 rpm durante 166 horas. Se observa como la concentración de biomasa fue aumentando a través del paso del tiempo para los dos medios de cultivo.

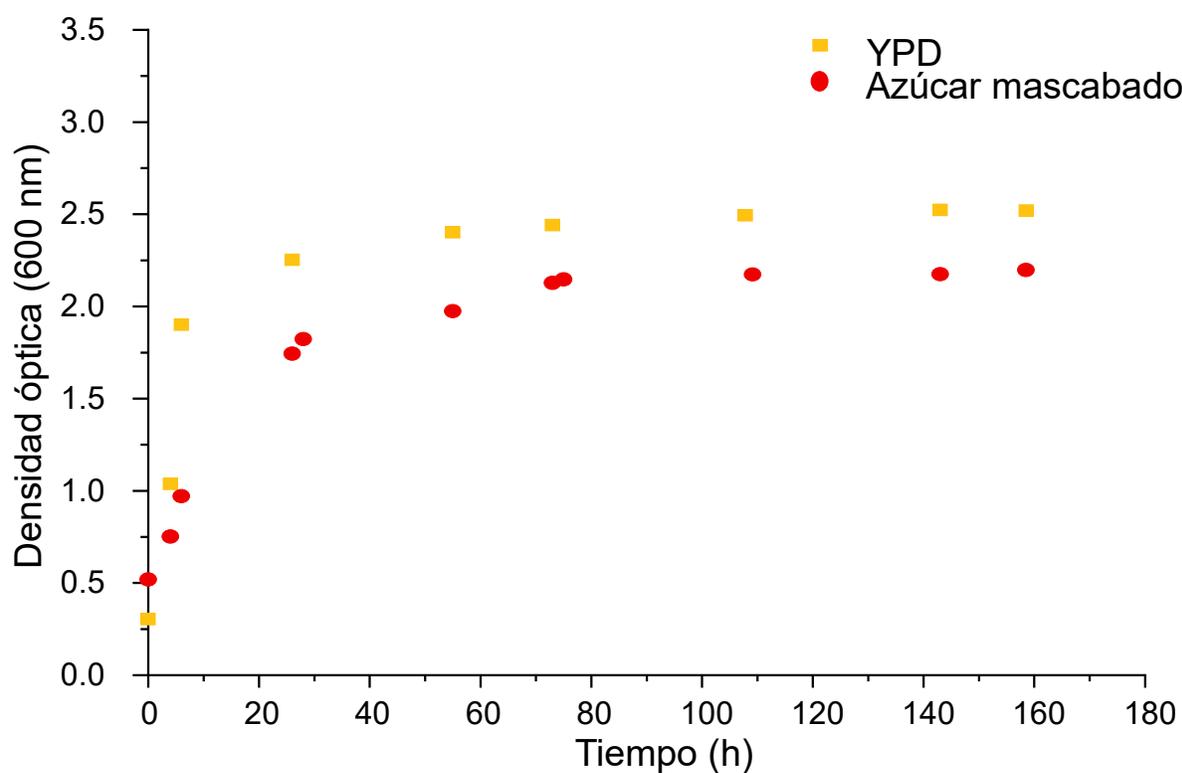


Figura 9. Comparación de la densidad óptica en medios de cultivo

En la Tabla 2 se muestran los datos obtenidos de la evaluación de cinética de crecimiento, donde se puede observar que el medio de cultivo YPD tiene mejor velocidad promedio específica y de duplicación, pero gracias a estos datos se puede decir que el medio de cultivo de azúcar mascabado es adecuado para utilizarlo en la elaboración de la bebida.

Tabla 2. Datos de cinética de crecimiento en diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Conteo inicial (cel/mL)	Conteo final (cel/mL)	Velocidad promedio específica (h⁻¹)	Velocidad promedio de duplicación (h)
YPD	4.86E+06	2.74E+08	0.251801238	10.38287413
Azúcar mascabado	4.21E+06	8.48E+07	0.17739218	7.49409632

IV.2 Evaluación del diseño experimental

IV.2.1 Azúcares totales por el método de antrona

A partir de la Figura 10 se puede observar el comportamiento de la concentración de azúcares totales para cada uno de los experimentos, donde la tendencia de este consumo depende de la concentración de azúcar inicial (100 y 200 g/L).

Debido a que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la encargada de consumir todo el azúcar presente en el medio, se puede observar que a las 258 horas de incubación se ha consumido casi todo el azúcar fermentable, lo que indica que el proceso de fermentación está por terminar.

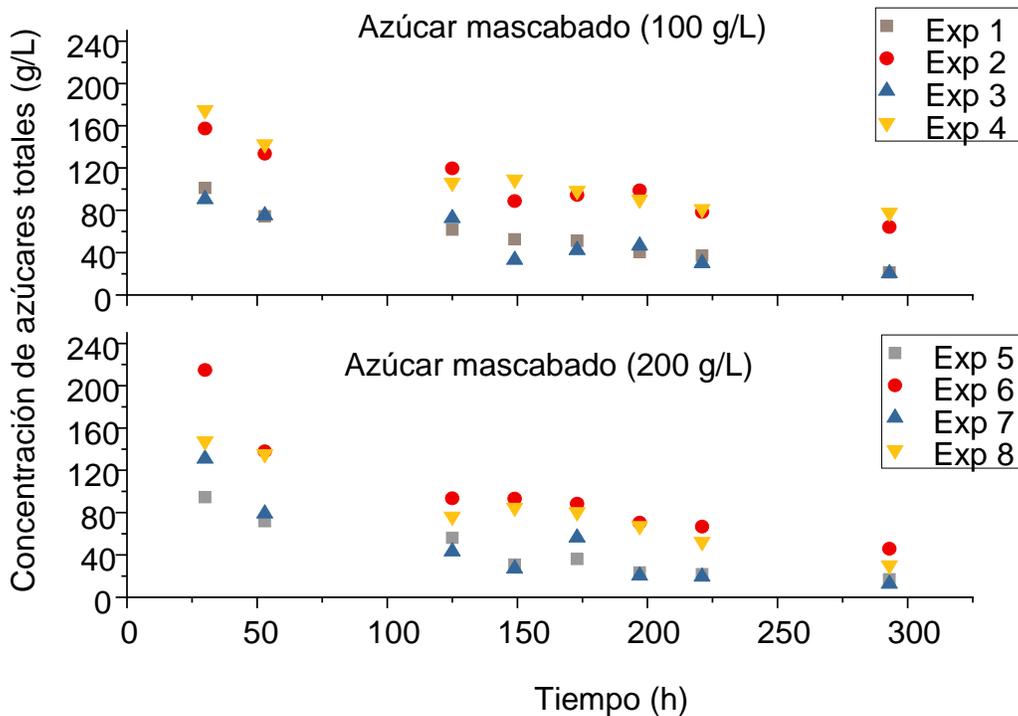


Figura 10. Comportamiento de azúcares totales bajo las condiciones de la matriz de experimentos

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos del consumo promedio de azúcares totales durante las 258 horas de incubación, obteniendo que el experimento 6 y 8 son los que tuvieron mayor consumo y mejor estabilidad durante el proceso.

Tabla 3. Consumo promedio de azúcares totales por el método de antrona

No. Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8
Consumo de azúcares totales (g/h)	0.034	0.027	0.036	0.030	0.030	0.055	0.040	0.044

IV.2.2 Azúcares reductores por el método de DNS

En la Figura 11 se puede observar que el comportamiento de la concentración de azúcares reductores no es estable, la causa de esto puede ser que la reacción de oxidación de azúcares reductores fue incompleta.

Así también, debido a que el comportamiento correcto de estos azúcares debe ir de una concentración alta e ir disminuyendo conforme pasa el tiempo, se puede observar que para los experimentos 1, 3, 5, 7 y 8 a partir de las 125 horas de incubación presentan este comportamiento y los experimentos 2, 4 y 6 lo presentan a partir de las 173 horas.

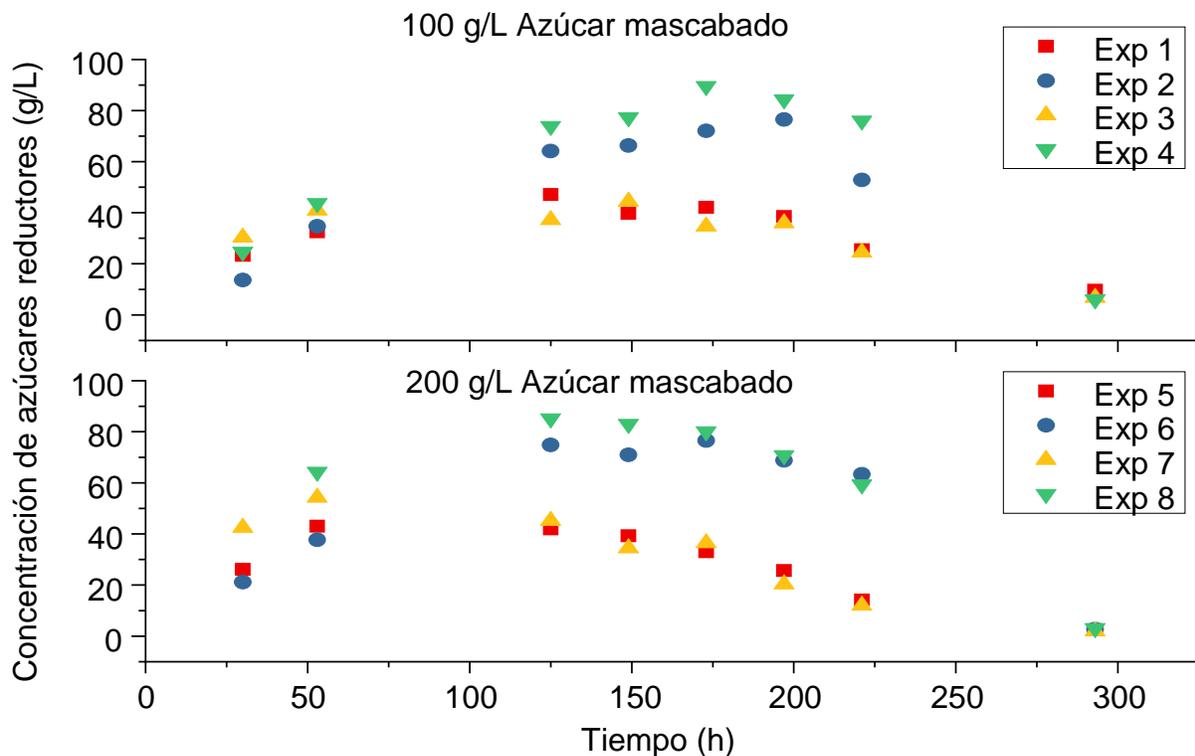


Figura 11. Comportamiento de azúcares reductores bajo las condiciones de la matriz de experimentos

En la Tabla 4 se puede observar que el experimento No. 8 es el más viable, ya que este se presentó una estabilización en menor tiempo y también siendo este el que tuvo un mayor consumo de azúcares tanto totales como reductores.

Tabla 4. Consumo promedio de azúcares reductores

No. Experimento	Consumo promedio de azúcares reductores (g/h)
1	0.005
2	0.026
3	0.009
4	0.001
5	0.012
6	0.001
7	0.019
8	0.026

IV.2.3 Análisis de pH

En la Figura 12 se muestra un comportamiento muy estable para cada uno de los experimentos donde el pH oscila entre los 2.5 a 3.5. Las bebidas fermentadas de este tipo suelen tener un rango de pH de 3.1 a 3.6.

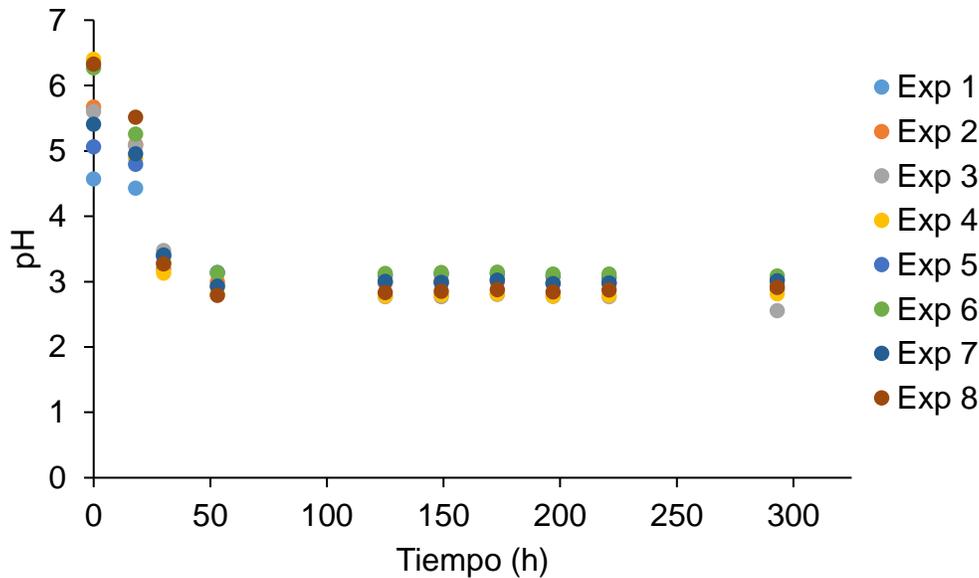


Figura 12. Comportamiento del pH

IV.2.4 Grados Brix

En la Figura 13 se muestra la curva de sólidos solubles totales durante la fermentación, se puede observar que la concentración de azúcar mascabado tiene una gran influencia sobre el comportamiento de cada uno de los experimentos.

Así también, el gran descenso en el contenido de sólidos solubles totales indica que hay una gran cantidad de azúcares en el medio lo que resulta favorecedor para el proceso fermentativo (Ramírez, Perez, Kafarov, Barajas, & Castillo, 2009)

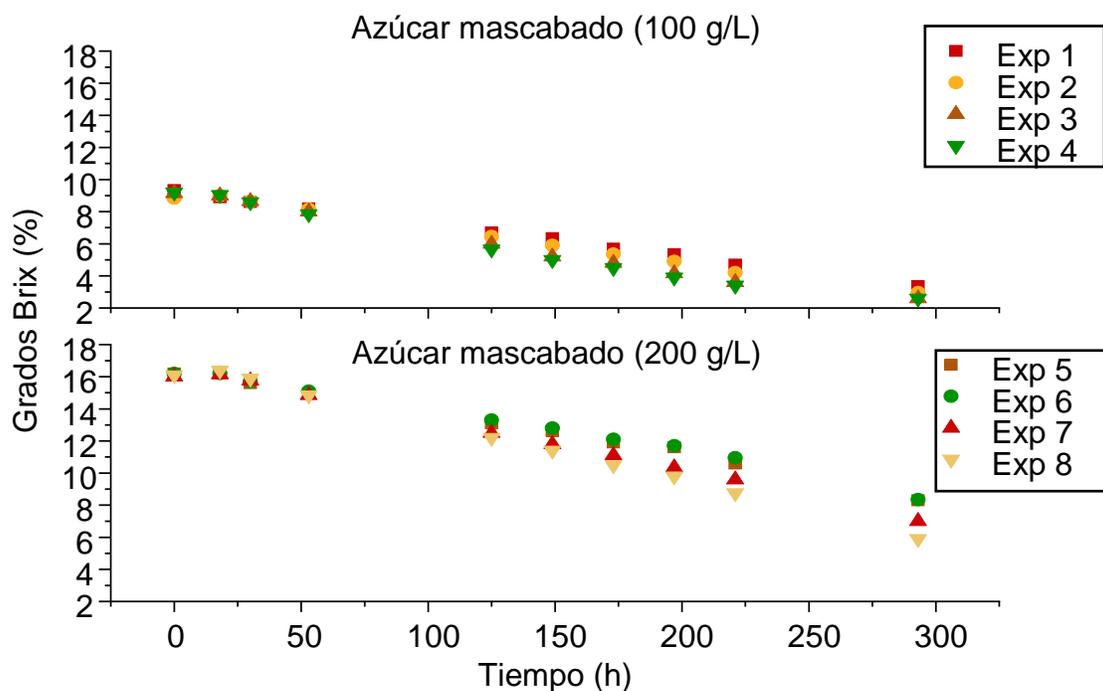


Figura 13. Comportamiento de grados Brix

A partir de la Figura 14 se puede observar el comportamiento sobre el consumo de sólidos solubles para cada uno de los experimentos. Es importante mencionar que entre mayor concentración de azúcar mascabado (200 g/L) se tiene un mayor consumo para dichos experimentos. Así también, se observa que el experimento No. 8 tiene mayor consumo, este con 0.037 g/h.

Por medio de la Tabla 5 se puede observar que tan eficiente fue cada uno de los experimentos para este análisis donde se indica que los experimentos No. 3 y 4 tienen la mayor eficiencia con un 72 %.

Tabla 5. Eficiencia en el consumo de sólidos solubles

No. Experimento	Eficiencia de consumo °Bx (%)
1	64
2	67
3	72
4	72
5	49
6	48
7	56
8	63

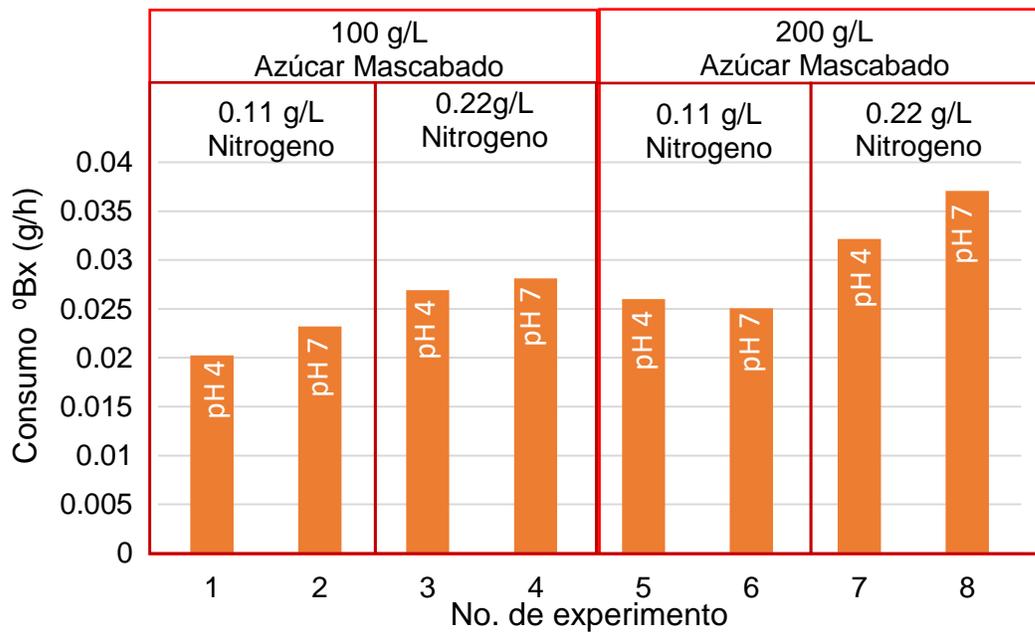


Figura 14. Consumo de grados Brix

IV.2.5 Producción de ácido cítrico

La producción de ácido cítrico se debe a la fermentación de azúcares como la sacarosa o la glucosa. Así también, la tendencia de una producción creciente de ácido cítrico está relacionada con la reducción de los valores de pH.

En la Figura 15 se observa que el experimento No.8 es el que tiene una mayor producción de ácido cítrico con 0.37 g/100mL lo cual permite decir que hay una fermentación favorable.

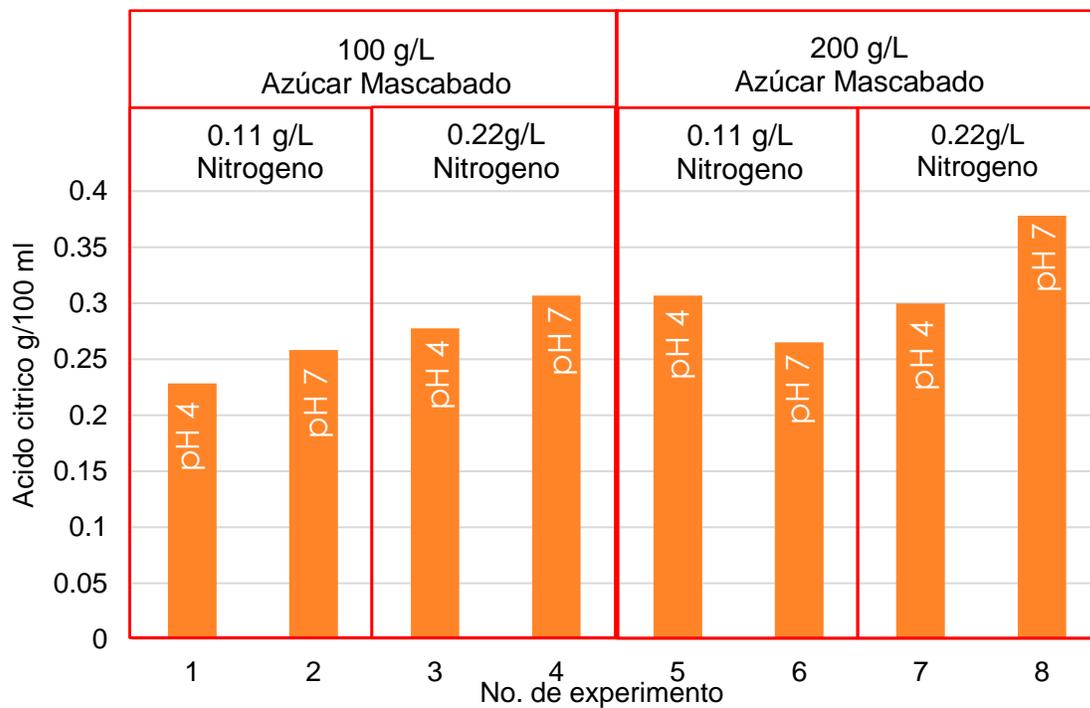


Figura 15. Producción de ácido cítrico

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 Conclusiones

A partir de todos los análisis fisicoquímicos realizados se puede concluir que el experimento No.8 es la mejor opción para desarrollar la fermentación bajo las condiciones de 200 g/L de concentración de azúcar mascabado, un pH de 7.0 y una concentración de nitrógeno 0.22 g/L.

Se logró concluir que el reactivo de antrona con el que se hicieron las pruebas para determinación de azúcares totales, es muy poco estable ya que si este se refrigera pierde efectividad al momento de utilizarlo. Gracias a esto se logró estandarizar la técnica.

Así también, a partir de las pruebas fisicoquímicas realizadas en cada uno de los experimentos se concluye que cada uno de los métodos utilizados fue el adecuado ya que se pudo observar una buena cinética de crecimiento en cada uno de los medios de cultivo utilizados.

V.2 Recomendaciones

Retomar la investigación utilizando la materia prima (fruto) con la que se realiza la bebida bajo las condiciones del experimento No.8.

Cuidar los detalles al momento de realizar cada uno de los análisis para así no tener errores como el que se presentó con los azúcares reductores por el método de DNS.

VI. ANALISIS DE LA EXPERIENCIA ADQUIRIDA

VI.1 Análisis general del programa, su diseño, desarrollo y organización

En general el programa de prácticas profesionales es de gran importancia ya que es la etapa de la carrera universitaria donde defines o te das una idea de donde y en qué área te gustaría trabajar en un futuro.

El programa de prácticas profesionales me parece que está muy bien diseñado ya que en el momento que se cumplen los créditos para poder realizarlas uno como estudiante ya cuenta con ciertos conocimientos y habilidades que te permiten desenvolverte fácilmente en un ambiente laboral.

Por otra parte, el ser parte de una empresa al menos por un tiempo establecido te permite el tener más confianza del trabajo que estas realizando y también el aprender cómo es la vida laboral.

El buen desarrollo de este programa, es decir el realizar las prácticas profesionales en una empresa donde el perfil de egreso este estrechamente vinculado de la licenciatura en curso, considero que te permite consolidar la formación profesional como estudiante a través de la aplicación de conocimientos teóricos y prácticos para así desarrollar habilidades y competencias profesionales en contextos laborales.

El haber realizado las prácticas profesionales en Rubio Pharma y Asociados S.A. de C.V., considero que fue una gran elección ya que tienen un área muy amplia de investigación y de desarrollo de nuevos productos, lo cual me enseñó que se puede realizar productos a partir de una investigación exitosa y estos pueden llegar a tener un lugar en el mercado.

Así también, la buena organización del programa de prácticas profesionales me permitió confirmar que adquirí distintos conocimientos durante la estadía en la empresa, ya que el realizar el reporte final te permite expresar y confirmar todo lo aprendido.

VI.2 Análisis de los objetivos del programa y grado de consecución

Uno de los objetivos del realizar las prácticas profesionales es poder ampliar los conocimientos teóricos y prácticos adquiridos durante las clases. Esto es muy importante porque al momento de estar en el ambiente laboral te enfrentas a situaciones que no se vieron en clase por lo que pude adquirir nuevos conocimientos y desarrollar habilidades las cuales me hicieron sentir con más confianza en el área de trabajo.

Por otra parte, la responsabilidad es un valor que reafirme ya que todo el trabajo o actividades que realice durante la estadía en la empresa tenían que llevarse a cabo de la mejor manera posible debido a que los resultados obtenidos eran reportados y de esto dependía el avance o retraso de la investigación que se estaba realizando.

Así mismo, el relacionarse con personas que están capacitadas y cuentan con experiencia en el área fue de gran apoyo para mí como estudiante, ya que es de la manera que más se aprende porque conocen como se realiza el trabajo en la empresa y te capacitan para poder desenvolverte y cumplir con las necesidades que el trabajo exija.

El trabajo en equipo es otro aspecto que en clases es muy común que se realice. Al momento de estar en la empresa tuve que trabajar con distintos compañeros lo cual me permitió desenvolverme adecuadamente para poder cumplir con los objetivos propuestos.

Por otra parte, puedo decir que el conocimiento que he adquirido a lo largo de la carrera fue de gran utilidad ya que me permitió ser más ágil para resolver problemas y a la toma de decisiones.

Por la experiencia que tuve puedo decir que se cumplieron todos y cada uno de los objetivos que tiene el realizar las prácticas profesionales ya que pude adquirir más confianza, conocimientos y habilidades. Así también, puedo decir que el área en la que estuve me permitió reafirmar el área donde me gustaría trabajar en un futuro.

VI.3 Análisis de las actividades realizadas

Las actividades que realice durante el periodo de prácticas profesionales considero que fueron acordes al perfil de egreso de un ingeniero químico, ya que por mi parte tengo gran entusiasmo por el ámbito de la investigación y el poder ser parte de un proyecto como este fue muy interesante.

En lo que se refiere a la experimentación, el estar realizando cada uno de los análisis fisicoquímicos y que por motivos de desajuste en las condiciones óptimas de los experimentos algunos se tuvieron que repetir varias veces. Por lo que, esto me enseñó que el trabajo de investigación es de mucha paciencia y de tener cuidado con los detalles para así evitar errores.

Por otra parte, la capacitación que se me dio para hacer uso de distintos equipos y material de laboratorio es importante, ya que son conocimientos que pude adquirir y que me serán útiles para ponerlos en práctica en algún lugar de trabajo.

Una de las actividades más importantes durante mi estadía en la empresa, fue el reporte de avances ya que todas las actividades que hacía durante el día tenían que ser registrarlas en una bitácora para poder llevar un control del trabajo de investigación.

El realizar diferentes tipos de problemas matemáticos como los que he realizado a lo largo de la carrera me fueron de gran ayuda para poder resolver y analizar algunos datos necesarios para poder continuar con el desarrollo del proyecto.

Así también, el hacerse cargo de la investigación de un proyecto es una gran responsabilidad, pero esto me permitió desarrollarme como estudiante y como persona, ya que en cada una de las actividades realizadas pude aplicar mis conocimientos y adquirir otros para poder cumplir satisfactoriamente con todos los objetivos que fueron planteados.

VI.4 Análisis de la metodología utilizada

Los pasos que se siguieron durante el desarrollo del proyecto de investigación considero que fueron los adecuados, ya que todo llevaba un orden para poder ir avanzando poco a poco en el proyecto.

Primeramente, tuve que leer sobre el tema a desarrollar y conocer un poco más del aspecto químico y biológico, de lo que conllevaba trabajar con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Así también, antes de comenzar con la experimentación tuve que estudiar cada uno de los procedimientos normalizados de técnicas para poder realizarlos en el laboratorio sin ningún inconveniente, esta metodología se me hizo totalmente correcta porque así antes de comenzar cualquier experimento surgen dudas que se pueden resolver con calma y no al momento de tener montados todos los experimentos, ya que esto podría causar retrasos sobre el desarrollo de la investigación.

Por otra parte, una vez que se terminó la primera parte de la experimentación se decidió continuar, pero ahora agregando distintas variables para poder ampliar el estudio y así obtener más información sobre el proceso de fermentación.

Como paso final en la empresa, los jefes del laboratorio pidieron un reporte y presentación para poder expresar todo lo que se realizó durante mi estadía para así poder analizar los resultados y conclusiones obtenidas durante ese periodo.

Gracias a la metodología que se siguió se pudieron obtener buenos resultados y así también pude ir aprendiendo de lo más sencillo a lo complejo. Esto me permitió desenvolverme en muchos aspectos como estudiante en la empresa.

VII. CONCLUSIONES DE LA EXPERIENCIA ADQUIRIDA

El haber realizado las prácticas profesionales en esta empresa puedo concluir que es la actividad curricular mejor implementada en los programas de licenciatura, ya que esta me permitió conocer el tipo de trabajo que se lleva a cabo en la empresa.

Así también, pude adquirir nuevos conocimientos tanto teóricos como prácticos y generar un poco de experiencia en un área de interés que es la investigación.

Por otra parte, el desarrollo de nuevos productos es un área muy interesante y que requiere de mucho estudio, por lo que, considero que me permitió adquirir nuevas habilidades para el desarrollo de nuevos productos a partir de una investigación exitosa y que estos pueden llegar a tener un lugar en el mercado.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Boyd, M. a., Antonio, M. a D., Hillier, S. L., Hernández, A., Martín, A., Aranda, E, Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales , reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 11(15), 346–351. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3143>.

Fern, E. L. (2007). Alimentos funcionales y nutraceuticos Alimentos funcionales y nutraceuticos.

González, A., Larrosa, M., García, M. T., Tomás, F. A., & Espín, J. C. (2013). Nutraceuticals for older people : Facts , fictions and gaps in knowledge. *Maturitas*, 75(4), 313–334. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.05.006>

Grünig, C. R., Queloz, V., Duò, A., & Sieber, T. N. (2009). Aprovechamiento Tecnológico Del Lactosuero Y El Gel Deshidratado De Opuntia Subulata Para La Elaboración De Una Bebida Nutraceutica. *Mycological Research*, 113(2), 207–221.

Iloki, A. S.B, Lewis, LL.M Gil, S. A.A, Acosta, S.A.L, Rivera, C. E. G. Rubio, P. J. L. Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of *Morinda citrifolia* L. (noni) grown in Mexico. *African Journal Biotechnology*

Lewis, M. (2014). Nutritional and Phenolic Composition of Morinda Citrifolia L. (Noni) Fruit at Different Ripeness Stages and Seasonal Patterns Harvested in Nayarit, Mexico. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(5), 421. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140305.19>

Muñiz, C, Borges, F, Abreu, F. De, Nassu, & Freitas (2002). Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. *B.ceppa*, 20(2), 309–322.

Norma Mexicana, Nmx-f-103. (1982), 11–14.

Production of table wine from processed tea bags using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, Elsevier, ScienceDirect (2012).

Puerta, G. (2010). Fundamentos Del Proceso De Fermentación En El Beneficio Del Café. Centro Nacional de Investigaciones de Café, 12. Retrieved from cenicafe@cafedecolombia.com

Ramírez, C., Perez, y., Kafarov, V., Barajas, C., & castillo, e. (2009). En mezclas de alimentación a destilerías en la producción dual azúcar – bioetanol en colombia, 22(1), 25–34.

Ramona Ávila N, Bernarda Rivas P, Rómulo Hernández, contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease, Centro de Investigaciones en Ciencias Básicas, multiciencias, Venezuela (2012).

Suárez, C., Garrido, N. A., & Guevara, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar, 50(1), 20–28