

**Estudio del efecto de la temperatura y la densidad celular de inóculo sobre la velocidad de crecimiento máxima de una levadura *Rhodotorula sp.***

**Danna Margarita Barrera Luna y Anderson Fabian Torres Morantes**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico**

**Director**

**Luis Javier López Giraldo**

**Doctor en Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos**

**Codirector**

**Claudia Johanna Sandoval Lozano**

**Magister en Microbiología**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

**Ingeniería Química**

**Bucaramanga**

**2023**

### **Dedicatoria**

*A Dios, primeramente, por ser mi sustento y mi fuerza.*

*A mis papás, Nelly Luna y Ever Barrera, por ser mi apoyo incondicional, por su amor inmensurable, por creer en mí, darme aliento cuando más lo necesitaba y acompañarme siempre en el cumplimiento de mis sueños.*

*A mis nonos, Luis y Carmen, quienes me acompañaron y apoyaron incansablemente, hasta el último momento, para que yo pudiera culminar esta etapa y aunque uno de ellos no pudo ver este proyecto realizado, sé lo orgulloso que estaría.*

*A mis abuelos, Pablo y Margarita, pilares de mi familia, por guiarnos a todos con sabiduría y amor; quienes a pesar de no saber leer ni escribir, levantaron toda una familia y a varias generaciones, con la motivación de estudiar y salir adelante. Sin ellos ninguno de nosotros estaría donde está.*

*A mis tías, Guillermina, Ligia, Rosana, Nary, Fernelly y Yudy, por ser mis maestras de vida, por su cariño, por ser apoyo, por cada palabra de aliento y por sus consejos en cada paso de mi vida.*

*A mi hermano, David, quien ha sido mi compañero de vida, quien me ha alentado, me ha inspirado a ser mejor, a persistir en medio de las circunstancias y a perseguir mis sueños, y a quien admiro profundamente.*

*A Adriana y Ángel, quienes fueron un apoyo indispensable, me brindaron ayuda en el momento que más necesitaba claridad y me guiaron para poder empezar este proceso.*

*A Laura, que me escuchó, me apoyó, me aconsejó y me dio la ayuda que necesité en el momento oportuno, su respaldo fue indispensable para desarrollar este proyecto.*

*A mis amigos, Juan David, Nataly y Nelly por hacer de este camino más llevadero, por dejar huella en mí y mostrarme que, con esfuerzo y dedicación, todo se puede lograr, se convirtieron en una segunda familia para mí.*

*A Luis, quien me acompañó desde el primer hasta el último día de este sueño, por ser mi amigo, mi consejero, por darme ánimo y motivarme, aún en medio de las circunstancias, aprendí mucho de ti.*

*A nuestros mentores, Luis Javier López y Claudia Sandoval, por su tiempo invertido en nosotros, por guiarnos con dedicación y ser piezas indispensables para poder llegar a la meta de manera satisfactoria.*

*A Natalia González y Mónica Niño, por enseñarnos, aconsejarnos, guiarnos con paciencia y alentarnos en el camino.*

*DANNA MARGARITA BARRERA LUNA*

*Este trabajo está dedicado a mis padres que me apoyaron en cada momento de mi vida, a mis hermanos que me ayudaron cuando me encontraba confundido, y a todas aquellas personas que han hecho de mi vida algo maravilloso. “Gracias Totales”*

*ANDERSON FABIAN TORRES MORANTES*

### **Agradecimientos**

A la Universidad Industrial de Santander y a la escuela de Ingeniería Química por aportarnos todo lo necesario para poder desarrollarnos como profesionales competentes.

Al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos - CICTA, y a todos sus integrantes por aportarnos y colaborarnos en cada paso de este proceso de aprendizaje.

## Tabla de contenido

Introducción.....	13
1. Objetivos.....	15
1.1 Objetivo General.....	15
1.2 Objetivos específicos .....	15
2. Estado del arte.....	15
3. Metodología .....	17
3.1 Determinar la temperatura y la densidad celular de inóculo que maximizan la velocidad de crecimiento de una levadura <i>Rhodotorula</i> sp. ....	17
3.1.1 Microorganismo. ....	17
3.1.2 Medio de Cultivo.....	18
3.1.3 Fermentación.....	18
3.1.4 Densidad Óptica (D.O).....	19
3.1.5 Peso Seco (DCW).....	19
3.1.6 Población en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) .....	20
3.1.7 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) .....	21
3.1.8 Estimación de velocidad máxima de crecimiento .....	22
3.1.8 Análisis estadístico .....	22
3.2 Ajustar los parámetros cinéticos que describen el crecimiento de una <i>Rhodotorula</i> sp. ....	23
3.2.1 Modelado cinético .....	23
4. Resultados.....	23
4.1 Características de la <i>Rhodotorula</i> sp.....	23
4.2 Medio de cultivo .....	24
4.3 Peso seco .....	25
4.4 Crecimiento celular .....	27
4.5 Determinación de la velocidad de crecimiento máxima .....	29
4.6 Análisis estadístico .....	29
4.7 Estimación de azúcares reductores .....	37
4.8 Modelo cinético .....	38
5. Conclusiones .....	42

6. Recomendaciones.....	43
Referencias Bibliográficas.....	44
Apéndices .....	48

**Lista de tablas**

Tabla 1. Población en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de muestra.....	24
Tabla 2. Valores de velocidad de crecimiento máxima .....	29
Tabla 3. Matriz experimental para el diseño. ....	30
Tabla 4. Análisis de varianza para la tasa de crecimiento .....	30
Tabla 5. Prueba de Tuckey con variable densidad celular .....	31
Tabla 6. Valores óptimos.....	36
Tabla 7. Modelos cinéticos.....	39
Tabla 8. Densidad óptica a temperatura de 25°C y densidad celular de inóculo de $10^6$ .....	50
Tabla 9. Densidad óptica a temperatura de 25°C y densidad celular de inóculo de $10^7$ .....	50
Tabla 10. Densidad óptica a temperatura de 25°C y densidad celular de inóculo de $10^8$ .....	51
Tabla 11. Densidad óptica a temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de $10^6$ .....	51
Tabla 12. Densidad óptica a temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de $10^7$ .....	52
Tabla 13. Densidad óptica a temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de $10^8$ .....	52
Tabla 14. Densidad óptica a temperatura de 30°C y densidad celular de inóculo de $10^6$ .....	53
Tabla 15. Densidad óptica a temperatura de 30°C y densidad celular de inóculo de $10^7$ .....	53
Tabla 16. Densidad óptica a temperatura de 30°C y densidad celular de inóculo de $10^8$ .....	54
Tabla 17. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 25°C; Densidad inóculo $10^6$ .....	54
Tabla 18. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 25°C; Densidad inóculo $10^7$ .....	55
Tabla 19. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 25°C; Densidad inóculo $10^8$ .....	55
Tabla 20. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 28°C; Densidad inóculo $10^6$ .....	56
Tabla 21. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 28°C; Densidad inóculo $10^7$ .....	56
Tabla 22. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 28°C; Densidad inóculo $10^8$ .....	57
Tabla 23. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 30°C; Densidad inóculo $10^6$ .....	57
Tabla 24. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 30°C; Densidad inóculo $10^7$ .....	58
Tabla 25. Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 30°C; Densidad inóculo $10^8$ .....	58

### Lista de figuras

Figura 1. Levadura <i>Rhodotorula</i> sp. perteneciente al laboratorio de Bioprocesos del CICTA .....	17
Figura 2. Siembra de levadura en caja petri, inóculo de 60mL y fermentación de 600mL, después de su crecimiento y fermentación bajo las condiciones estipuladas .....	18
Figura 3. Muestras del procedimiento de peso seco .....	20
Figura 4. Muestras preparadas para HPLC.....	21
Figura 5. <i>Rhodotorula</i> sp. con 48 horas y 8 días de incubación a 30°C .....	23
Figura 6. Relación entre la densidad óptica y el peso seco .....	26
Figura 7. Crecimiento microbiano a lo largo de la fermentación bajo las condiciones propuestas .....	27
Figura 8. Diagrama de pareto para la tasa de crecimiento .....	32
Figura 9. Gráfica de residuales .....	33
Figura 10. Gráfica de interacción para la tasa de crecimiento.....	34
Figura 11. Superficie de respuesta estimada .....	35
Figura 12. Consumo de sustrato a lo largo de las 60 horas de fermentación .....	38
Figura 13. Ajuste de datos al modelo cinético.....	38
Figura 14. Ajuste modelo de Monod .....	40
Figura 15. Ajuste modelo de Teissier. ....	40
Figura 16. Ajuste modelo de Mosser .....	40
Figura 17. Ajuste modelo de Contois.....	41
Figura 18. Diluciones seriadas de $10^{-1}$ a $10^{-6}$ .....	48
Figura 19. Siembra por extensión de una dilución seriada, después de 48 horas en incubación ..	49
Figura 20. Crecimiento microbiano en la fase exponencial de cada experimento .....	59

**Lista de apéndices**

Apéndice A. Diluciones seriadas y siembra por extensión. ....	48
Apéndice B. Cálculo de unidades formadoras de colonia (UFC).....	48
Apéndice C. Determinación del crecimiento celular en la fermentación.....	49
Apéndice D. Determinación de la velocidad de crecimiento. ....	54
Apéndice E. Modelos cinéticos. ....	61

## Resumen

**Título:** Estudio del efecto de la temperatura y la densidad celular de inóculo sobre el crecimiento de una levadura *Rhodotorula sp.*\*

**Autores:** Danna Margarita Barrera Luna, Anderson Fabian Torres Morantes.\*\*

**Palabras clave:** *Rhodotorula sp.*, crecimiento microbiano, parámetro cinético, temperatura, densidad celular de inóculo.

**Descripción:** Las levaduras del género *Rhodotorula sp.* son una alternativa interesante para la obtención de pigmentos, tales como los carotenoides. Una levadura de este género fue aislada previamente desde cajones de fermentación de cacao, pero a la fecha no se han determinado las condiciones para iniciar a diseñar un proceso de fermentación que permitan su producción. El presente estudio tuvo como objetivos investigar el efecto de la temperatura y la densidad celular de inóculo sobre el crecimiento de una levadura *Rhodotorula sp.*, además de plantear un ajuste de parámetros cinéticos para el mismo. El seguimiento se realizó sobre una fermentación, evaluando la respuesta (velocidad de crecimiento) conforme se variaron la densidad de inóculo y la temperatura de trabajo. Como resultado del análisis estadístico, usando el software Statistica, se encontró que una temperatura de 28°C y una densidad celular de  $10^6$  UFC/mL son las condiciones más favorables para maximizar la velocidad de crecimiento. Luego de optimizadas las condiciones se procedió a desarrollar una fermentación bajo esas condiciones con dos propósitos, el primero validar la capacidad predictiva del modelo estadístico; y el segundo, ajustar los parámetros cinéticos que describen el crecimiento de la levadura.

---

\* Trabajo de Grado.

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Ingeniería Química. Director: Luis Javier López Giraldo Doctor en Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos. Codirector: Codirector: Claudia Johanna Sandoval Lozano. Magister en Microbiología.

### Abstract

**Title:** Study of the effect of temperature and inoculum cell density on the growth of a yeast *Rhodotorula sp.*

**Authors:** Danna Margarita Barrera Luna, Anderson Fabian Torres Morantes.\*\*

**Key words:** *Rhodotorula sp.*, microbial growth, kinetic parameter, temperature, inoculum cell density.

**Description:** The yeasts of the genus *Rhodotorula sp.* are an interesting alternative for obtaining pigments, such as carotenoids. A yeast of this genus was previously isolated from cocoa fermentation crates, but to date the conditions have not been determined to begin to design a fermentation process that would allow its production. The objectives of this study were to investigate the effect of temperature and inoculum cell density on the growth of a yeast *Rhodotorula sp.* and to propose an adjustment of kinetic parameters for the same. The monitoring was performed on fermentation, evaluating the response (growth rate) as the inoculum density and working temperature were varied. As a result of the statistical analysis, using Statistica software, it was found that a temperature of 28°C and a cell density of 10<sup>6</sup> CFU/mL are the most favorable conditions to maximize the growth rate. After optimizing the conditions, we proceeded to develop a fermentation under these conditions for two purposes: first, to validate the predictive capacity of the statistical model; and second, to adjust the kinetic parameters that describe yeast growth.

---

\* Bachelor Thesis.

\*\* Faculty of Physico-chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Chemical Engineering. Director: Luis Javier López Giraldo. Doctor in Chemistry, Biochemistry and Food Science. Co-director: Claudia Johanna Sandoval Lozano. Master of Microbiology.

## Introducción

A medida que pasa el tiempo, los procesos han venido evolucionando en las diferentes industrias, con el objetivo de adaptarse más a las necesidades y deseos del consumidor, a fin de lograr que el producto final tenga mayor aceptación en el mercado. Como consecuencia, se han implementado gran variedad de aditivos artificiales, algunos de éstos, con la intención de dar color al producto, sin adicionar riesgos o efectos nocivos que éstos pudieran llegar a desarrollar en el ser humano y su entorno (Gómez, 2017).

Al conocer y tener en consideración esta problemática, se busca a través de los diferentes campos de la investigación promover estudios con el propósito de encontrar alternativas para la producción aditivos, usando diferentes organismos y especies que como parte de su metabolismo produzcan el colorante como una respuesta natural de su funcionamiento, tal como la generación de pigmentos (Gómez, 2017).

En el caso de Colombia, es importante destacar que es un país que goza de una gama amplia de ecosistemas y dinámica climática, y aunque es menos abordado en este marco, cabe resaltar su relevancia como uno de los países donde se concentra gran parte de las especies de microorganismos que habitan el planeta (Toro, 2004).

Al contemplar su riqueza en biodiversidad microbiana, la investigación y estudio de los tipos de microorganismos, las condiciones adecuadas de crecimiento, caracterización, entre otros factores, es preciso para identificar los procesos con posible potencial biotecnológico y sus vías más factibles, sencillas y económicas, de modo que se pueda generar un impacto, al aumentar el desarrollo de avances, incidiendo a nivel científico, económico, ético y social.

Actualmente, uno de los campos de interés, en el cual se está documentando al respecto, es la obtención de pigmentos, empleando diferentes fuentes presentes en el ambiente, como lo es la *Rhodotorula sp.*, una levadura que cuenta con un metabolismo que le faculta para sintetizar pigmentos, rosados o rojizos, como respuesta ante la incidencia de rayos UV (Segura, 2018).

En aras de profundizar en esta temática, tener un primer acercamiento a una levadura *Rhodotorula sp.*, y conocer la incidencia que tienen ciertas variables sobre su crecimiento, se propone que el enfoque de la investigación corresponda a la búsqueda de una respuesta a: ¿Qué efecto tiene la temperatura y la densidad celular de inóculo sobre el crecimiento de una levadura *Rhodotorula sp.*?

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la temperatura y la densidad celular de inóculo sobre la velocidad máxima de crecimiento de una levadura *Rhodotorula sp.*

### 1.2 Objetivos específicos

Determinar la temperatura y la densidad celular de inóculo que maximizan la velocidad de crecimiento de una levadura *Rhodotorula sp.*

Ajustar los parámetros cinéticos que describen el crecimiento de una *Rhodotorula sp.*

## 2. Estado del arte

Previamente se ha determinado que levadura *Rhodotorula sp.* puede crecer en un amplio rango de condiciones de temperatura, pH, humedad, densidad celular de inóculo, aireación, entre otros; sin embargo, estos parámetros que condicionan el crecimiento, pueden optimizarse con el fin de producir cierto metabolito de la levadura.

Por ejemplo, Segura (2018) realizó experimentos con diferentes intensidades de luz ultravioleta, tomando muestras de biomasa, para obtener datos de crecimiento celular y así determinar parámetros cinéticos que ayudarán a obtener una conclusión en términos de rendimiento de producto/sustrato y biomasa/sustrato para la producción de carotenoides. La fermentación se llevó a cabo en condiciones de  $T=22^{\circ}\text{C}$ , pH 6 y una densidad de inóculo de

$1,5 \times 10^6$  cel/mL. Por su parte Yashaswini et al. (2022) (Yashaswini Nagavara Nagaraj, 2022) realizó la identificación y el estudio cinético de la producción de los carotenoides y lípidos producidos por la levadura *Rhodotorula toruloides* CBS 14 cultivada en hidrolizado de paja de trigo. Realizó fermentaciones con la levadura a condiciones de  $T=25$  °C con una agitación de 140 rpm y pH 6. También Jana (2018) (Jana Tkáčová, 2018) estudio el crecimiento, la formación de lípidos y carotenoides de *Rhodotorula glutinis* a condiciones de cultivo de  $T=28$ °C, densidad de inóculo de  $10^5$  cel/mL y agitación de 180 rpm. El análisis cinético incluía, crecimiento celular, contenido de ácidos grasos y carotenoides. De los estudios anteriores se aprecia que, en los últimos años ha habido un interés en determinar las condiciones de cultivo que favorecen el crecimiento y formación de pigmentos (caroteinodes) en levaduras del género *Rhodotorula* sp., el cual también es el interés de este trabajo, en el que se usa una levadura que hace parte del cepario del laboratorio de bioprocesos del CICTA, y que podría ser potencialmente atractiva para la producción de este tipo de pigmentos.

### 3. Metodología

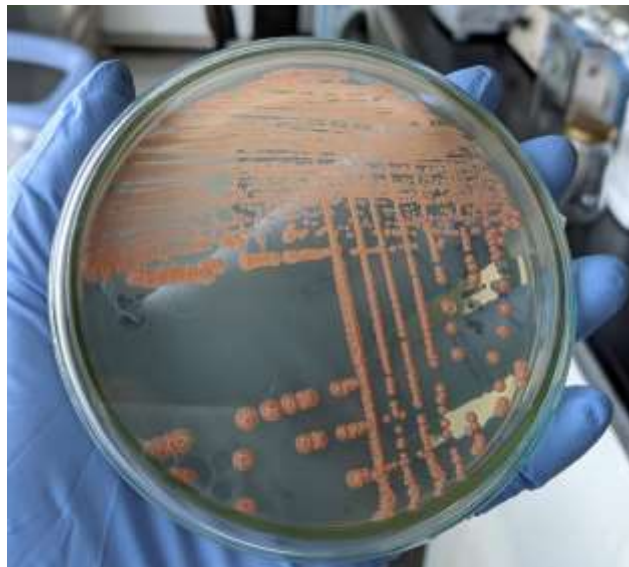
#### 3.1 Determinar la temperatura y la densidad celular de inóculo que maximizan la velocidad de crecimiento de una levadura *Rhodotorula sp.*

##### 3.1.1 Microorganismo.

El género de la levadura usada en este estudio fue *Rhodotorula sp.* Esta levadura hace parte del cepario del laboratorio de Bioprocesos del CICTA de la Universidad Industrial de Santander, la cual se muestra en la Figura 1. La cepa de levadura fue sembrada en una caja de petri por agotamiento. Posteriormente, se incubó a 30°C durante 48 horas.

#### Figura 1

*Levadura Rhodotorula sp. perteneciente al laboratorio de Bioprocesos del CICTA.*



### **3.1.2 Medio de Cultivo.**

Se utilizó el medio sólido de Agar Papa Dextrosa (PDA) (Merck, Alemania) atendiendo a las instrucciones del fabricante, con el fin de aislar la levadura. Por otro lado, para llevar a cabo la siembra del inóculo y la fermentación, se preparó un medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa (Merck, Alemania).

### **3.1.3 Fermentación.**

El proceso de fermentación se llevó a cabo usando Extracto de levadura Peptona-Dextrosa, conocido bajo las siglas YPD (Yeast Extract–Peptone–Dextrose), con una composición de glucosa al 2%, peptona al 2% y extracto de levadura al 1% (Merck, Alemania). Se evaluaron tres temperaturas, de 25, 28 y 30°C, y tres densidades celulares de inóculo, correspondientes a  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL, en simultáneo. Se realizó un inóculo con un volumen de 60 mL de YPD, el cual se incubó bajo las condiciones de temperatura y densidad celular de inóculo de estudio y 200 rpm durante un tiempo de 12 a 48 horas, dependiendo de las densidades celulares que se buscaron obtener. La fermentación se llevó a cabo en un erlenmeyer con volumen de trabajo de 600 mL de YPD a 200 rpm durante 60 horas. La Figura 2 ilustra las etapas del proceso, llevado a cabo desde la siembra de la levadura *Rhodotorula sp.*, pasando por la siembra en el inóculo y posteriormente, la fermentación.

### **Figura 2**

*Siembra de levadura en caja petri, inóculo de 60mL y fermentación de 600mL, después de su crecimiento y fermentación bajo las condiciones estipuladas.*



### ***3.1.4 Densidad Óptica (D.O)***

El seguimiento del crecimiento microbiano se monitoreó por medio de la técnica de espectrofotometría tomando muestras de 1 mL, cada 4 horas durante las primeras 36 horas de fermentación y cada 8 horas durante las últimas 24 horas de la misma. De esta forma, se midió el valor de densidad óptica, haciendo uso del espectrofotómetro (Analytica S.A.S), el cual está ajustado a una longitud de onda de 600 nm para realizar cada una de las lecturas.

### ***3.1.5 Peso Seco (DCW)***

Se realizó la medición de peso seco de la biomasa. Para este procedimiento, se tomaron muestras de 30 mL, las cuales se centrifugaron a 8000xg y una temperatura de 8°C, que se observa en la ilustración izquierda, se descartó el sobrenadante, luego la pasta obtenida (biomasa), que se muestra en la ilustración derecha de la Figura 3, se secó a una temperatura de 90°C en horno, y se dejó en desecador hasta alcanzar peso constante, el cual fue medido en una balanza analítica.

**Figura 3**

*Muestras del procedimiento de peso seco.*



### ***3.1.6 Población en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL)***

Los resultados de la densidad celular en el inóculo, la fermentación en el punto inicial, o sea a la hora cero, y la fermentación en su punto final, tras las 60 horas establecidas, fueron calculados, en UFC/mL, tras llevar a cabo siembras masivas con las muestras tomadas al inóculo, posterior a sus horas de incubación, y a la fermentación al inicio y al final.

Para corroborar el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo, se tomaron muestras de 1 mL, de los erlenmeyer, utilizando la micropipeta y se depositaron en tubos eppendorf. En tubos falcon, ocupados con 9 mL de agua peptonada, se depositó el mililitro tomado de muestra para empezar con la dilución  $10^{-1}$  y de esta misma forma, continuar hasta la dilución  $10^{-4}$ , en el caso de la fermentación en la hora cero y hasta la dilución  $10^{-6}$ , en el caso

del inóculo y la fermentación en la hora sesenta, dado que era el rango de dilución en el que el número de unidades formadoras de colonias estaba en el intervalo de 30-300 en las placas de petri para su conteo.

### ***3.1.7 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)***

El seguimiento de consumo de glucosa se efectuó al tomar muestras de 2,5 mL, cada 4 horas durante las primeras 36 horas de fermentación y cada 8 horas durante las últimas 24 horas de la misma, se prepararon y se evaluaron a la técnica de HPLC Thermo dionex Ultimate 3000, siguiendo el procedimiento interno del laboratorio de alimentos CICTA.

Se pesaron 2,5 g de muestra en un tubo falcon y se le adicionaron 10 mL de agua tipo 1; se sometieron las muestras preparadas a ultrasonido por 5 minutos, se homogenizaron utilizando el vortex por 2 minutos y posterior a esto, se llevaron a la centrífuga, a unas condiciones de 4000rpm y temperatura ambiente, durante 15 minutos. El sobrenadante fue vertido en una fiola de laboratorio, en la cual se aforó la muestra hasta 25 mL con agua tipo 1. Al finalizar, se removió parte del contenido de la fiola, con asistencia de una jeringa, con el fin de pasarlo por medio de un filtro de 0,45µm y llenar un vial de vidrio, de 1,5 mL, con 1 mL de muestra preparada, como se ve en la Figura 4. Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de analizar el contenido de azúcares, y su consumo, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

#### **Figura 4**

*Muestras preparadas para HPLC.*



### ***3.1.8 Estimación de velocidad máxima de crecimiento***

Al tener los resultados del crecimiento microbiano y del procedimiento de peso seco, fue posible relacionarlos y graficar los valores de la biomasa, conforme pasa el tiempo, en escala logarítmica. De esta forma, se logró identificar las fases de crecimiento, haciendo énfasis en la fase exponencial para cada experimento, se generó la ecuación de la línea de tendencia en esta fase y se asoció, tomando como referencia la Ec. 1, y de esta forma, se encontraron los valores correspondientes para las velocidades de crecimiento máxima en cada caso.

$$\ln(X) = \mu t \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo la variable  $X$  equivalente a la biomasa,  $\mu$  hace referencia a la velocidad de crecimiento y  $t$  al tiempo.

### ***3.1.8 Análisis estadístico***

El manejo de datos se realizó con un diseño de experimentos factorial de 2 variables y 3 niveles; se usó el análisis de varianza ANOVA con un intervalo de confianza del 95%. Todos los análisis se desarrollaron en el software Statistica.

### **3.2 Ajustar los parámetros cinéticos que describen el crecimiento de una *Rhodotorula sp.***

#### **3.2.1 Modelado cinético**

Para la obtención valores de los parámetros de crecimiento cinético, se seleccionó un modelo que se adapte al comportamiento de la levadura. Los modelos, que se evaluaron, son del tipo no estructurados-no segregados, considerando la levadura como un componente distribuido uniformemente en el cultivo. Por lo tanto, se usaron las ecuaciones de Verhulst-Pearl, Pirt y Luedeking Piret para evaluar el crecimiento de biomasa y consumo de sustrato (Hernández, 2014).

## **4. Resultados**

### **4.1 Características de la *Rhodotorula sp.***

La levadura *Rhodotorula sp.*, cultivada en el medio sólido PDA, mostró un crecimiento pausado en comparación con levaduras de otro género, por ejemplo, la de tipo *Saccharomyces*, dado que el tiempo en el cual se pudo identificar colonias separadas fue de 48 horas y apenas después de 8 días de cultivo se apreció un crecimiento representativo, en las placas incubadas a 30°C. La Figura 5 muestra, en la imagen del lado izquierdo, el crecimiento obtenido para la levadura luego de 48 horas de incubación, mientras en la imagen del lado derecho muestra la levadura luego de 8 días de incubación.

#### **Figura 5**

*Rhodotorula sp.* con 48 horas y 8 días de incubación a 30°C.



#### 4.2 Medio de cultivo

Las proporciones de peptona, glucosa y extracto de levadura operaron como fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes necesarios para el crecimiento de la *Rhodotorula sp.*, al generar así un medio de cultivo propicio, logrando como consecuencia una adaptación y desarrollo positivo de la levadura *Rhodotorula sp.* durante las etapas de inóculo y fermentación hasta las 60 horas. Esta afirmación se puede inferir del comportamiento mostrado en la Tabla 1, de las que es pertinente mencionar que, se aprecia un crecimiento por parte del microorganismo, a las diferentes temperaturas y densidades celulares estudiadas en la evolución de la fermentación. En la Tabla 1 también se aprecia que hay incrementos de la densidad celular de hasta 3 órdenes de magnitud para la fermentación desarrollada a 28°C y densidad de inóculo de  $10^6$ .

**Tabla 1**

*Población en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de muestra.*

Temperatura [°C]	Densidad celular [UFC/mL]		
	Inóculo	Fermentación (0 horas)	Fermentación (60 horas)
25	1E+06	2,56E+05	1,15E+07
	1E+07	1,61E+06	5,45E+07
	1E+08	3,85E+06	1,38E+08

28	1E+06	1,39E+05	1,56E+08
	1E+07	7,50E+06	9,55E+07
	1E+08	1,34E+07	1,04E+08
30	1E+06	4,00E+05	2,40E+07
	1E+07	1,15E+06	3,80E+07
	1E+08	1,88E+07	7,55E+07

En los datos, suministrados en la tabla anterior, se puede observar que los valores para la densidad celular aumentan en uno, dos o tres órdenes, entre el tiempo inicial (0 horas) y el tiempo final (60 horas), siendo 28°C y  $10^6$  UFC/mL las condiciones a las cuales se logra el mayor aumento, trascurrida la fermentación. En la literatura no se reporta este tipo de seguimiento, lo más cercano a él que se encuentra señala que, luego de llevarse a cabo entre 48 y 72 horas de proceso fermentativo, la población de una levadura de género *Rhodotorula* alcanza un número de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL (Castoria et al., 2005) valor que se acerca al que se obtuvo en 6 de los casos experimentales, al completar 60 horas de fermentación.

Por otro lado, si bien la *Rhodotorula sp.* no culmina su fase exponencial, luego de 60 horas de fermentación, se puede inferir que la población que alcanza un crecimiento representativo, en el caso de 28°C y  $10^6$  UFC/mL, dado que si se compara con levaduras como las de género *Saccharomyces*, de ésta también existen reportes en los que su crecimiento en UFC/mL es de 3 órdenes a las 60 horas de proceso fermentativo (Pereira et al., 2013).

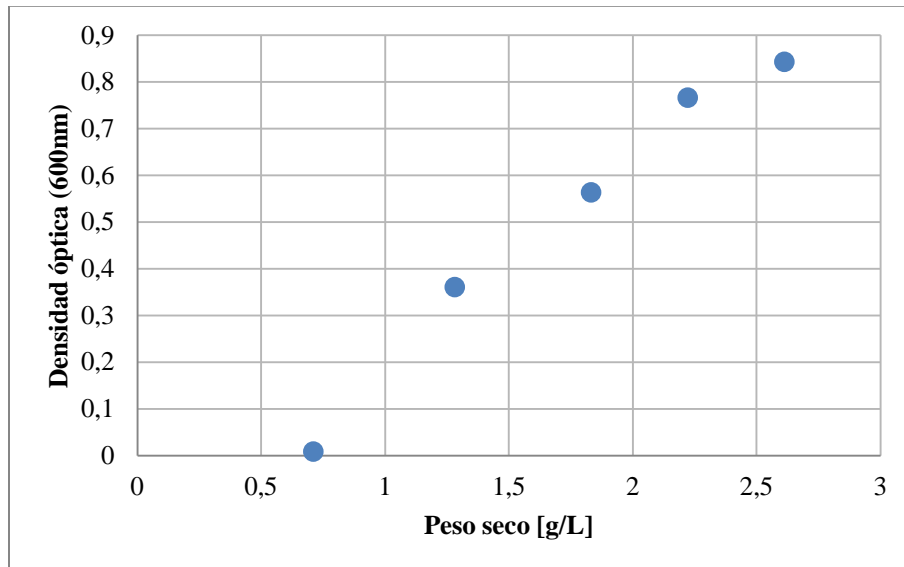
#### 4.3 Peso seco

La Figura 6 expone que los valores de concentración celular tienen una tendencia creciente, conforme aumenta el tiempo, partiendo con un valor inicial aproximado, en la hora cero de fermentación, de 0,7148 g/L. Un caso comparable se puede apreciar en el reporte de Wai Xian Lau et al. (2018), en el cual se señaló que la concentración celular inicial en un

procedimiento de peso seco para una levadura *Rhodotorula mucilaginosa* tuvo un valor de 0,76 g/L. De igual modo, se evidencia que se alcanza un valor aproximado de 3,2417 g/L en la hora 15 de fermentación. Por otro lado, se encuentra una relación entre la densidad óptica y el peso seco, al ver que, conforme una de estas variables aumenta, la otra sigue este mismo comportamiento.

### Figura 6

*Relación entre la densidad óptica y el peso seco.*



A partir de los puntos obtenidos del procedimiento, se realizó una regresión lineal, de esta forma se obtuvo una ecuación que relaciona las medidas de densidad óptica, con concentraciones y se calcularon los valores de biomasa para realizar el respectivo análisis de crecimiento microbiano, utilizando la Ec. 2.

$$[Biomasa] = \frac{DO+0,2617}{0,4425} \quad (\text{Ec. 2})$$

#### 4.4 Crecimiento celular

En la Figura 7 se aprecia el comportamiento de crecimiento de la levadura conforme se modifica la temperatura y la densidad celular del inóculo.

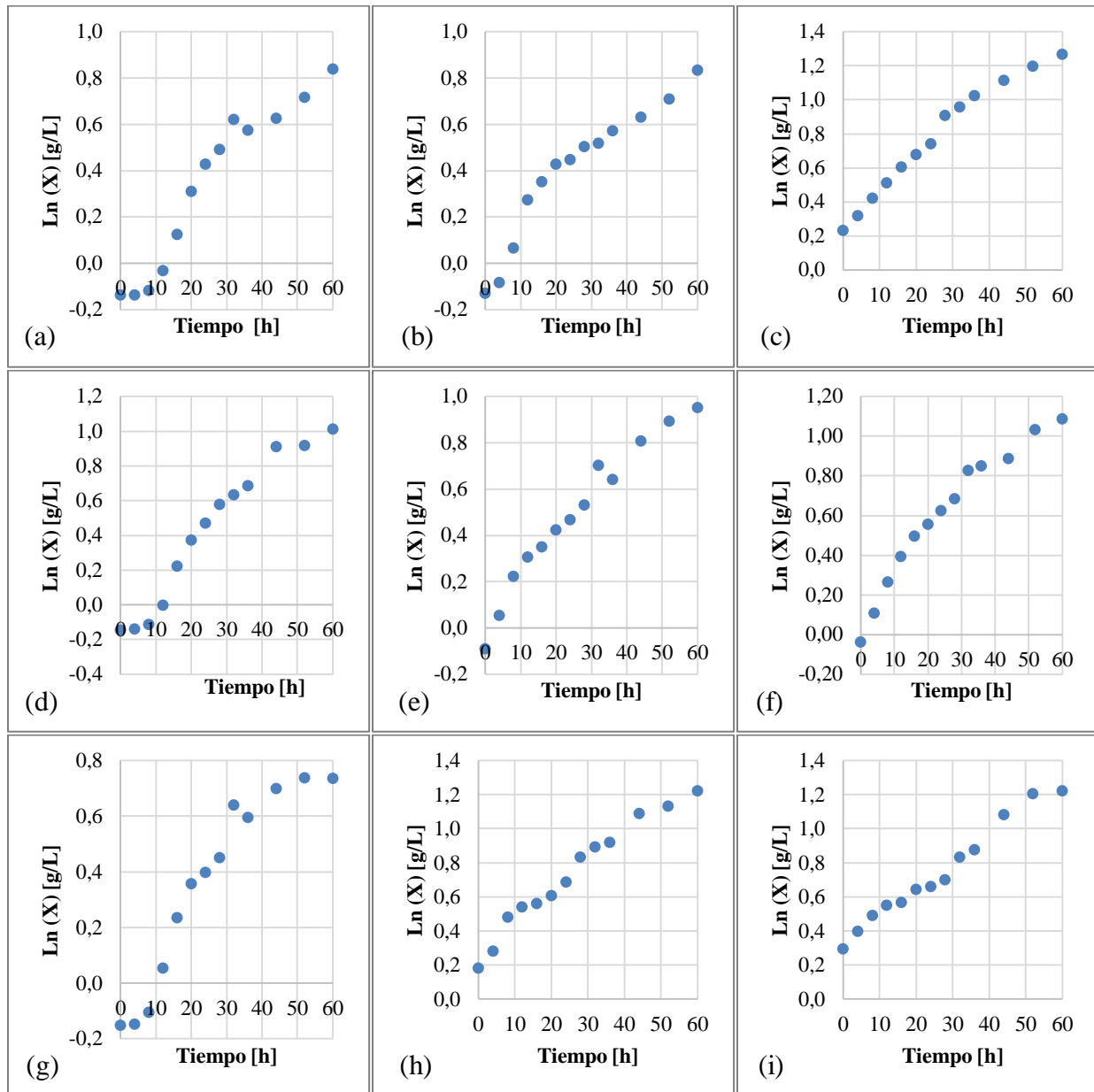
Algo semejante ocurre en la Figura 7, donde se puede notar la dinámica que sigue la levadura haciendo posible la identificación de las fases de crecimiento de la misma, a las condiciones dispuestas para cada experimento. Es posible señalar, a su vez, que los tiempos de fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaria, que se perciben en la figura mencionada, experimentan alteraciones para esta levadura *Rhodotorula sp.* en el transcurso de las 60 horas de fermentación, al variar los valores de temperatura y densidad celular de inóculo.

Es notable para los tres casos que, al aumentar la densidad celular del inóculo, la fase de latencia se hace más corta, a temperatura constante, hasta llegar al caso en que puede iniciar la fermentación y de inmediato, la fase exponencial directamente, como se evidencia en la Figura 7 para los experimentos en los que la densidad celular del inóculo es  $10^8$  UFC/mL.

Por otro lado, la fase exponencial tiene un comportamiento semejante al variar su temperatura, y mantener la densidad celular del inóculo constante, notando que ésta se alcanza, al transcurrir la misma cantidad de horas aproximadamente; caso contrario ocurre si se evalúa la densidad celular del inóculo y se mantiene constante la temperatura, logrando ver que la fase exponencial empieza en menos tiempo, a medida que se va aumentando este valor de densidad. No obstante, se puede evidenciar que la pendiente, para el menor valor de densidad celular del inóculo,  $10^6$  UFC/mL, en los 3 casos de temperaturas evaluadas (25°C, 28°C y 30°C) es más pronunciada.

#### Figura 7

*Crecimiento microbiano a lo largo de la fermentación bajo las condiciones propuestas.*



Nota. (a) 25°C,  $10^6$  UFC/mL; (b) 25°C,  $10^7$  UFC/mL; (c) 25°C,  $10^8$  UFC/mL; (d) 28°C,  $10^6$  UFC/mL; (e) 28°C,  $10^7$  UFC/mL; (f) 28°C,  $10^8$  UFC/mL; (g) 30°C,  $10^6$  UFC/mL; (h) 30°C,  $10^7$  UFC/mL; (i) 30°C,  $10^8$  UFC/mL.

En los experimentos se observa que ninguno de ellos logra concluir su fase exponencial y, por lo tanto, no se logra identificar la fase estacionaria, tras las 60 horas de fermentación. La descripción de este comportamiento es esperada, dado que, de acuerdo con Z. Aksu, A. Tuğba

Eren (2005) y Sharma, Ghoshal (2020), la fase estacionaria para la levadura de género *Rhodotorula* es alcanzada aproximadamente luego de 90 horas de fermentación, o más, dependiendo de su especie. Sin embargo, es importante aclarar que para este estudio no era prioridad exponer todas las fases de crecimiento para cada experimento, sino poder revisar el comportamiento e influencia, de cada una de las variables de estudio, con la finalidad de encontrar las condiciones más favorables para el crecimiento de la levadura *Rhodotorula sp.*

#### 4.5 Determinación de la velocidad de crecimiento máxima

De los datos, presentado en la Tabla 2, se puede lograr un primer acercamiento e inferir que bajo las condiciones de temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/mL, la levadura *Rhodotorula sp.* tiene una tasa de crecimiento microbiano mayor.

**Tabla 2**

*Valores de velocidad de crecimiento máxima.*

Temperatura [°C]	Densidad celular inóculo [UFC/mL]	$\mu_{m\acute{a}x}$ [1/h]
25	1E+06	0,0329
	1E+07	0,0253
	1E+08	0,0229
28	1E+06	0,0359
	1E+07	0,0222
	1E+08	0,0256
30	1E+06	0,0328
	1E+07	0,0221
	1E+08	0,0147

#### 4.6 Análisis estadístico

Con el fin de llevar a cabo el análisis estadístico del diseño factorial de dos variables y tres niveles, se reemplazaron los valores de los niveles de temperatura y densidad celular de

inóculo por -1, 0, 1, como está planteado en la Tabla 3, señalando con -1 al punto inferior, 0 el punto central y 1 al punto superior de cada una de las variables a analizar.

**Tabla 3**

*Matriz experimental para el diseño.*

Experimento	Temperatura	Densidad celular inóculo	$\mu_{m\acute{a}x}$
1	-1	-1	0,0329
2	-1	0	0,0253
3	-1	1	0,0229
4	0	-1	0,0359
5	0	0	0,0222
6	0	1	0,0256
7	1	-1	0,0328
8	1	0	0,0221
9	1	1	0,0147

Al organizar los valores de las variables en la matriz experimental para el diseño, se ingresaron los datos de cada experimento en el software estadístico Statistica, versión 14.1 en el que, al procesar la información suministrada, con un intervalo de confianza del 95%, generó los resultados, del análisis de varianza, consignados en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Análisis de varianza para la tasa de crecimiento.*

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,000038	2	0,000018	2,4128	0,2373
B: Densidad celular inóculo	0,000282	2	0,000141	18,137	0,0211
AB	0,0000164	1	0,000016	2,1087	0,2424
Error total	0,0000233	3	0,000007		
Total	0,0003594	8			

Los datos resultantes del análisis ANOVA, demuestran que el factor B: Densidad de inóculo, es la variable con mayor efecto en la velocidad máxima de crecimiento. Aunque la temperatura no cumple con el criterio de relevancia, sigue siendo una variable indispensable para este estudio, por lo tanto, se tomará el valor óptimo, el cual propicia un crecimiento de biomasa más veloz, para continuar con la práctica, el cual se reporta más adelante. Las interacciones entre las variables estudiadas, tampoco tienen gran efecto en la variable dependiente.

La ecuación obtenida para el cálculo de la velocidad máxima se observa en la Ec. 3.

$$\mu_{max} = 0,0250556 - 0,00191667T - 0,0064DI - 0,00278333T^2 - 0,002025(T)(DI) + 0,00426667(T * DI)^2 \text{ (Ec. 3)}$$

Se realizó una prueba de significancia, por medio de una comparación de medias utilizando la prueba Tuckey. A continuación, podemos ver los resultados de la prueba tomando la variable “Densidad de Inóculo”.

**Tabla 5**

*Prueba de Tuckey con variable densidad celular.*

Niveles de densidad celular			
	-1	0	1
-1		0,025317	0,011351
0	0,025317		0,757021
1	0,011351	0,757021	

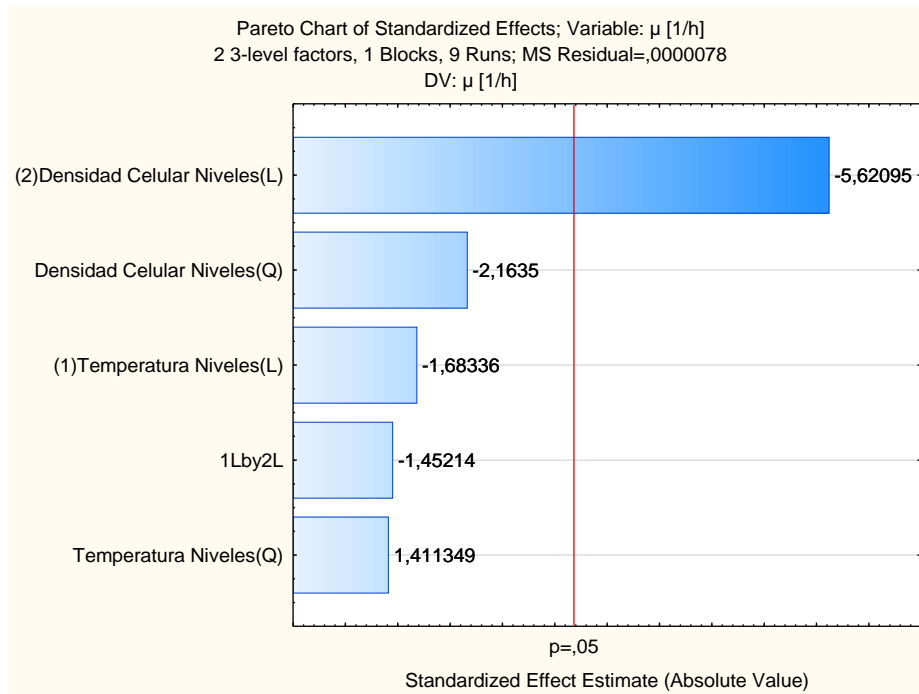
Se toma la variable densidad de inóculo debido a que en el análisis ANOVA, se concluyó que era la más influyente en la variable dependiente.

Con esta prueba, podemos se puede concluir que, si existen diferencias significantes entre los valores de velocidad máxima, ya que se obtienen valores menores 0,05 que fue la significancia definida para este análisis. Las diferencias significativas se muestran entre las velocidades obtenidas de nivel de densidad celular 0 ( $10^7$ UFC/mL), -1 ( $10^6$ UFC/mL) y entre 1 ( $10^8$  UFC/mL) y -1 ( $10^6$  UFC/mL). Esto da a entender que, al utilizar un valor de densidad celular mayor, la diferencia entre velocidades será mucho menor, por lo tanto, llegará un punto en el que aumentar la densidad de inóculo no ayudará a modificar el valor de velocidad máxima de crecimiento.

De igual forma, el software de estadística organizó los datos en un diagrama de pareto, en el cual, al jerarquizar las interacciones entre las variables, como se muestra en la Figura 8, es posible inferir que la variable ‘Densidad celular de inóculo’ ejerce un efecto significativo; mientras que en el rango evaluado de la variable ‘Temperatura’ y las interacciones entre las variables no hay efecto significativo. Además, se aprecia que el efecto de “Densidad celular de inóculo” es negativo, lo cual indica que es inversamente proporcional a “Velocidad máxima de crecimiento”.

### **Figura 8**

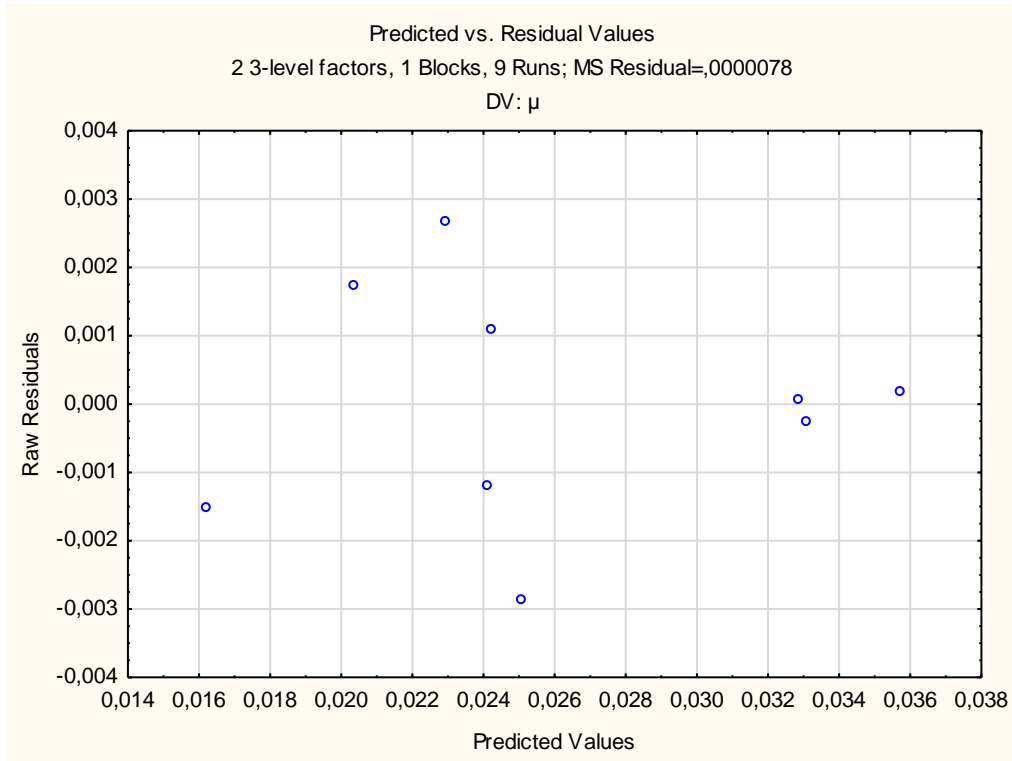
*Diagrama de pareto para la tasa de crecimiento.*



En este caso, en la Figura 9, se puede observar que los datos tienen una dispersión alta y la varianza de los datos disminuye a medida que los valores de velocidad máxima aumentan. Esto nos indica un ajuste certero en el modelo estadístico.

**Figura 9**

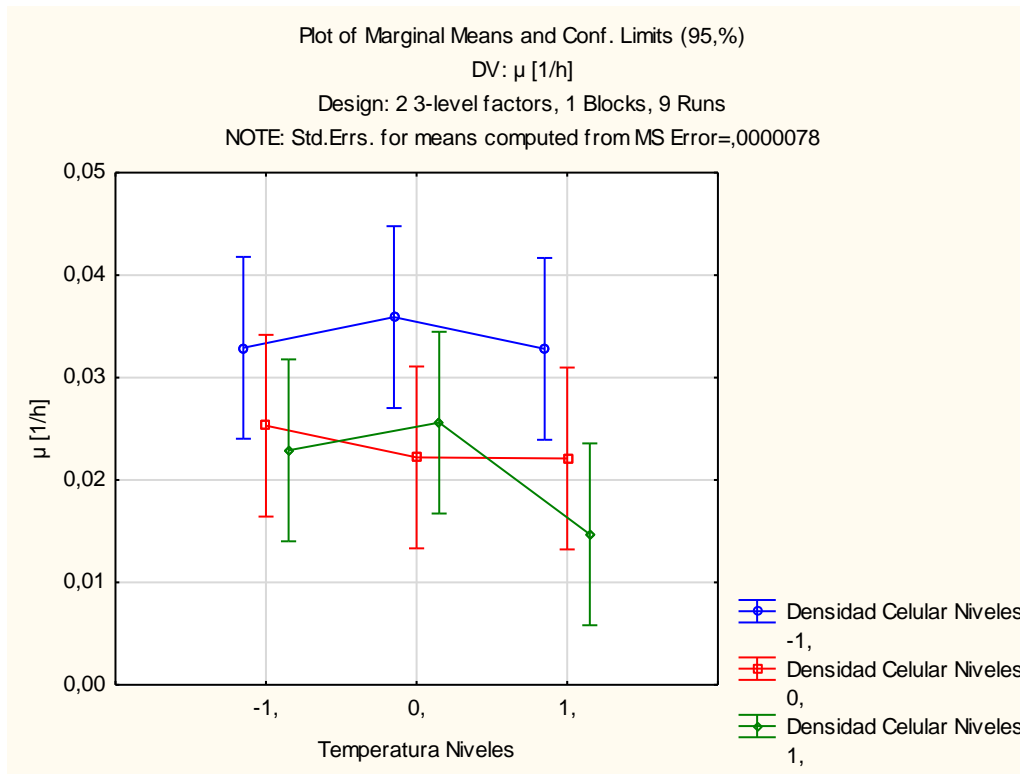
*Gráfica de residuales.*



En la Figura 10, se observan las interacciones entre las variables estudiadas. En eje de las ordenadas se encuentran los valores de temperatura, en las abscisas la variable independiente “velocidad máxima de crecimiento” y las funciones mostradas representan los valores de la variable de densidad de inóculo. Cada color, indica un valor de densidad de inóculo, representadas de la siguiente forma: azul= -1 ( $10^6$ UFC/mL), rojo=0 ( $10^7$ UFC/mL) y verde=1 ( $10^8$ UFC/mL).

**Figura 10**

*Gráfica de interacción para la tasa de crecimiento.*

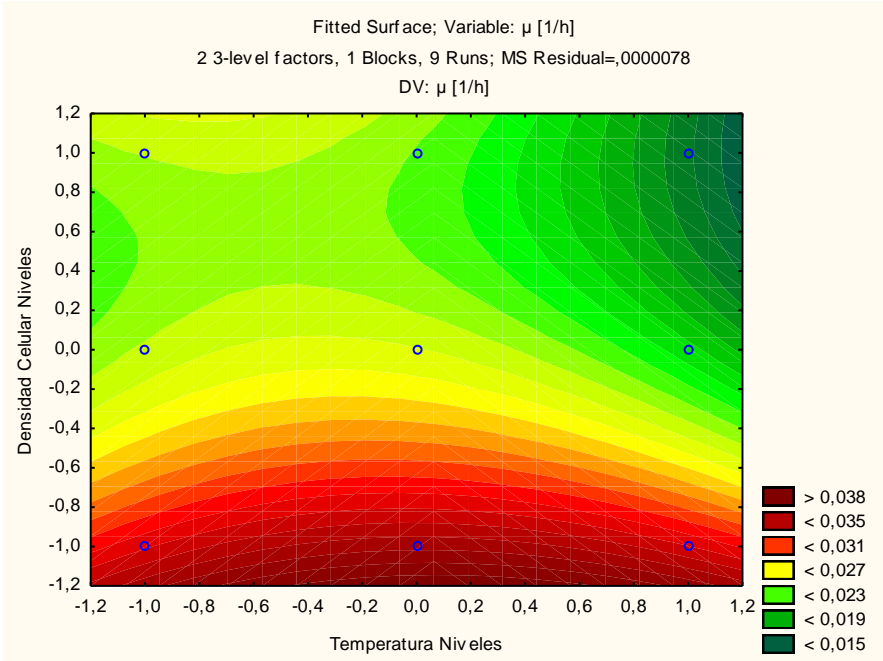
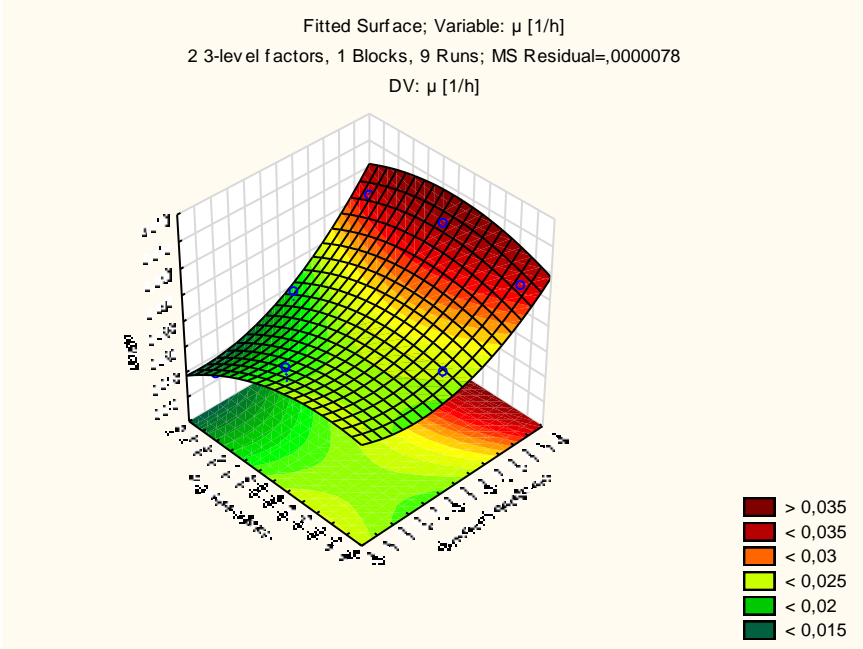


El punto más alto de la gráfica, nos indica cual es el mayor valor de velocidad máxima de crecimiento en el estudio realizado. La combinación de temperatura y densidad celular de inóculo son 0, -1; lo cual nos indica que las condiciones de temperatura de 28°C y densidad de inóculo de  $10^6$  UFC/ml.

Se puede apreciar en la Figura 11, la gráfica de superficies de respuesta junto con la de contornos, en estas se puede evidenciar de una forma mucho más detallada las interacciones entre variables y el comportamiento de la variable dependiente. Se puede concluir que la velocidad de crecimiento, tiende a aumentar en bajos valores de densidad de inóculo. La temperatura tiene cierto efecto en cuanto a la variación de la variable dependiente, ya que se puede divisar cierto aumento en temperaturas entre -0,4 y 0,2 (26°C y 28,5°C).

### Figura 11

*Superficie de respuesta estimada.*



**Tabla 6**

*Valores óptimos.*

Predicción	Inferior 95% límite	Superior 95% límite	
0,0357233	0,0291082	0,0423384	

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	-1,0	1,0	0,0192224
Densidad celular inóculo	-1,0	1,0	-1,0

Con este análisis se obtiene que los valores óptimos para la fermentación de *Rhodotorula sp.* Se encuentran en el punto central de la variable temperatura y en el punto inferior de la variable densidad de inóculo, por lo tanto, se considera que las mejores condiciones para el experimento es una temperatura de 28°C y una densidad de inóculo 10<sup>6</sup> UFC/mL.

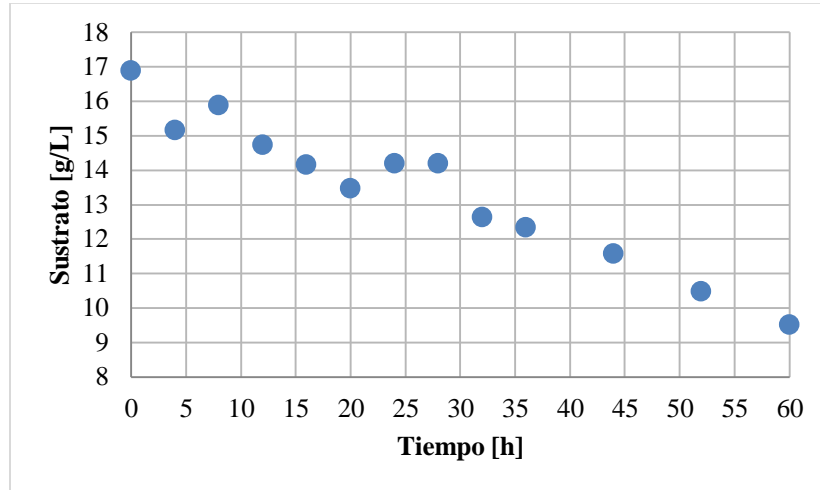
#### 4.7 Estimación de azúcares reductores

Este estudio reveló contenido de glucosa en las muestras, producto esperado ya que al medio de crecimiento en la fermentación se aportó un 2% de este reactivo, el cual se va consumiendo, como se puede ver en la Figura 12, donde se destaca un comportamiento decreciente conforme pasa el tiempo de la fermentación, al tener un valor aproximado inicial y máximo, en la hora cero, de 16,8750 g/L y un valor aproximado, y mínimo, en la hora 60 de fermentación de 9,4975 g/L. Al revisar estos datos del consumo de glucosa, es posible señalar que la conversión del sustrato fue de 43,7% aproximadamente, lo cual es un valor pequeño, teniendo en cuenta que está por debajo del 50%. Se considera que este resultado se obtuvo dado que el tiempo de fermentación estuvo limitado a las 60 horas, es posible que sea relevante cambiar la forma en la que se suministre la alimentación al proceso.

Este estudio fue efectuado para una fermentación bajo las condiciones más favorables que resultaron del análisis estadístico, las cuales corresponden a una temperatura de 28°C y una densidad celular de inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/mL.

**Figura 12**

*Consumo de sustrato a lo largo de las 60 horas de fermentación.*

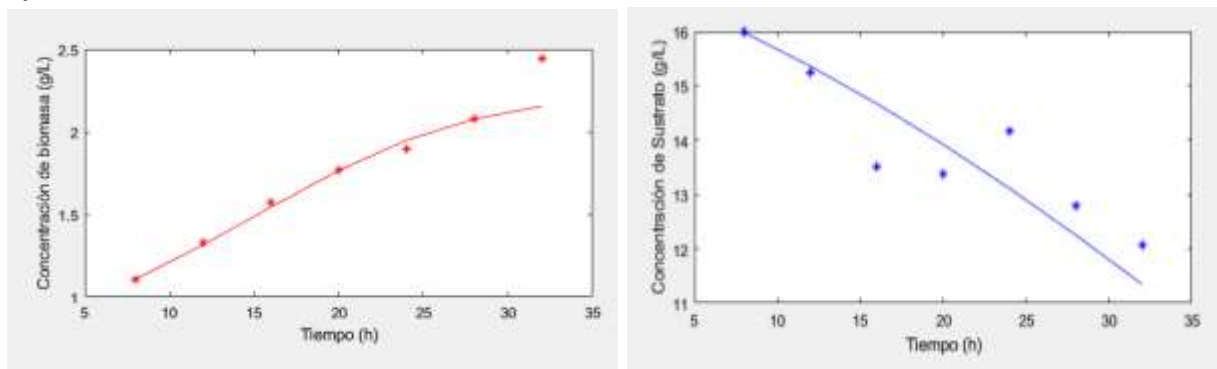
**4.8 Modelo cinético**

El modelamiento matemático se llevó a cabo con modelos de tipo no estructurados no segregados. El modelado cinético se realizó utilizando las ecuaciones de Verhulst-Pearl para el crecimiento de biomasa.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{Max} * X * \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (\text{Ec. 4})$$

El modelo se ajustó con un error del 2,73%. Los datos se optimizaron por medio del software MATLAB, reportando valores de  $\mu_{Max}$  0,074 1/h,  $X_{max}$  2,2467 g/L, rendimiento biomasa sustrato 0,3978 g biomasa/g sustrato y mantenimiento celular de 0,0309. El valor de la velocidad máxima de crecimiento concuerda con lo reportado por (Hernández, 2014). Valores reportados por otros autores oscilan el valor de 0,04 1/h (Segura, 2018). El rendimiento biomasa-sustrato se asemeja a lo calculado por (Shick Rhee, 1986) estimado en 0,45 g biomasa/g sustrato.

**Figura 13**

*Ajuste de datos al modelo cinético.*

También se realizaron cálculos con diferentes modelos cinéticos de la literatura, para comparar diferentes opciones y de esta forma tomar una decisión de cuál de estos podría describir el comportamiento del crecimiento de la levadura. Se hizo uso de los modelos de Monod (Ec. 5), Teissier (Ec. 6), Mosser (Ec. 7) y Contois (Ec. 8).

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{k_s+S} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\mu = \mu_{max}[1 - \exp(-k_s \times S)] \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\mu = \frac{\mu_{max}S^n}{k_s+S^n} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\mu_g = \frac{\mu_{max}S}{k_{sx}X+S} \quad (\text{Ec. 8})$$

A continuación, se pueden apreciar los parámetros calculados de 4 modelos cinéticos.

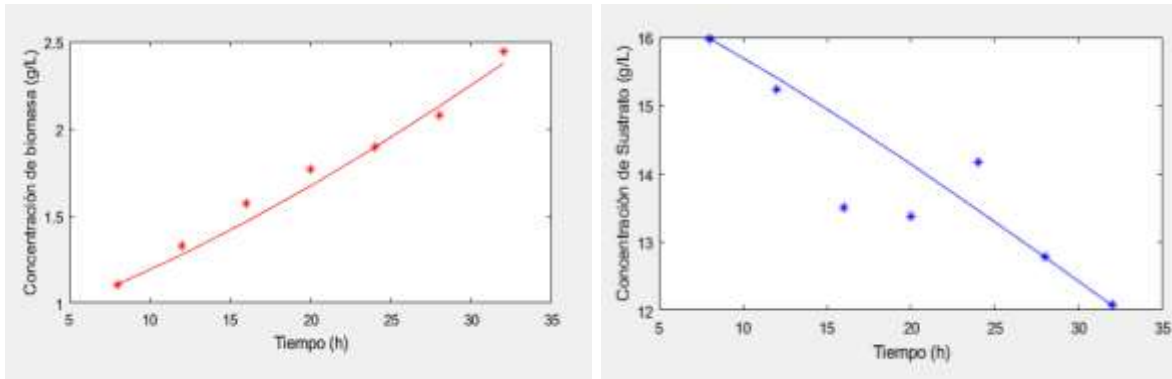
**Tabla 7**

*Modelos cinéticos.*

Modelo	$\mu_{max}$ [ $h^{-1}$ ]	$K_s$ [g/g]	$Y_{xs}$ [g/g]	$m_p$	Error
Monod	0,6071	249,99	0,278	0,0016	4,449
Teissier	0,0457	11.0202	0.5228	0.0366	4,672
Mosser	0.0362	10.9660	0.6019	0.0413	3,31
Contois	0,0896	14.2026	0.4221	0.0175	2,649

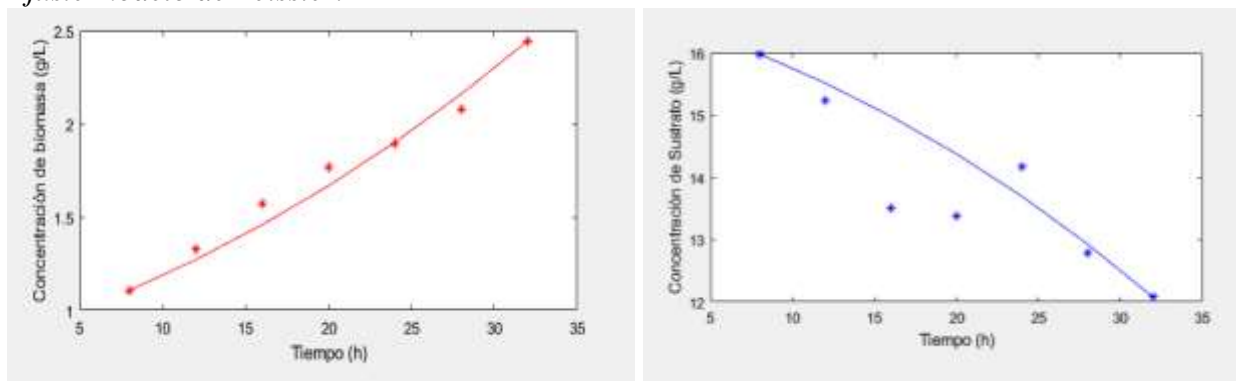
**Figura 14**

*Ajuste modelo de Monod.*



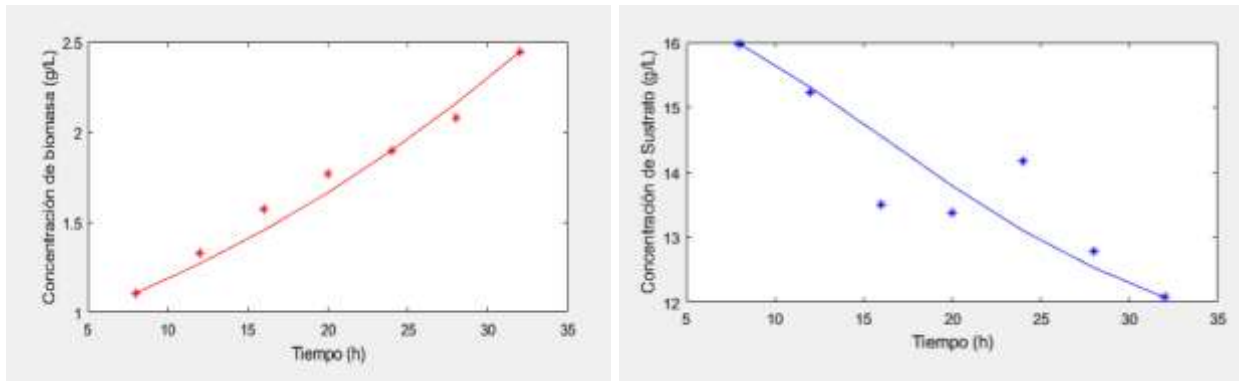
**Figura 15**

*Ajuste modelo de Teissier.*



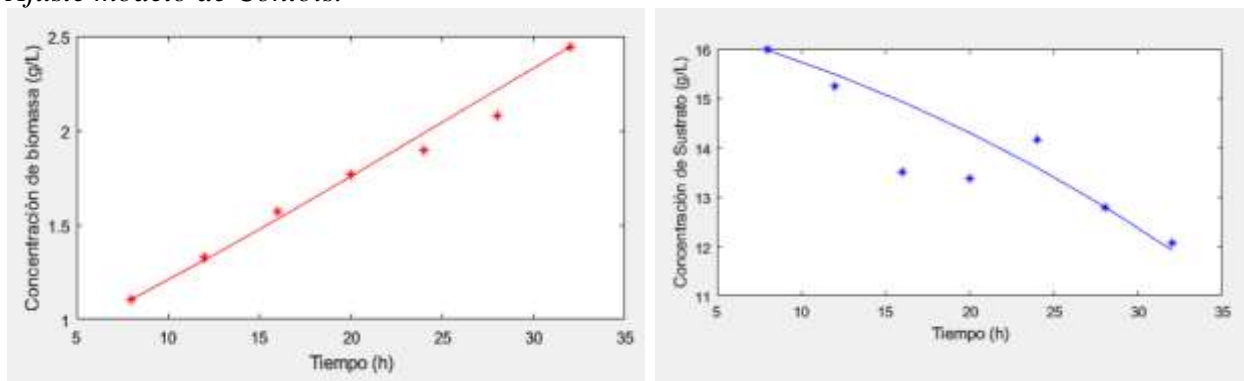
**Figura 16**

*Ajuste modelo de Mosser.*



**Figura 17**

*Ajuste modelo de Contois.*



Los modelos que mejor se ajustan de forma más certera son el modelo Logístico o de Verhulst-Pearl y el de Contois, ya que estos cuentan con un error bajo, y los valores se encuentran en un rango de respuesta coherente. El modelo de Contois tiende a modelar crecimientos de microorganismos que son inhibidos por biomasa (Alejandro RINCÓN SANTAMARÍA, 2018) y cuenta con una constante de desaturación que es proporcional a la concentración celular, esto puede describir un bajo crecimiento por la concentración de sustrato en altas densidades celulares. Por el contrario, el modelo de Monod no conlleva a una lectura correcta de los datos, ya que el ajuste de la constante de saturación por sustrato es demasiado alto y no concuerda con lo encontrado en la literatura (Loredano PollegioniS, 1993).

Al observar los parámetros calculados y tomando en consideración el consumo de sustrato, la biomasa máxima y el tiempo de fermentación, se puede inferir que la levadura utilizada en este experimento tiene un crecimiento lento. Algunos de los experimentos realizados con diferentes cepas de *Rhodotorula* tienen tiempos de fermentación bastante amplios, por ejemplo (Gargi Ghoshal, 2020) en su estudio para obtener carotenoides de una cepa de *Rhodotorula muscilaginosa* llevaba a cabo fermentaciones de 120 h.

Si comparamos la velocidad de crecimiento y producción de biomasa de la *Rhodotorula* con levaduras de otros géneros, podemos ver una diferencia abismal en los valores de consumo de sustrato, velocidad de crecimiento y tiempos de fermentación. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* estudiada por (Zeinelabdeena, 2018) en un tiempo de fermentación de 24h tuvo un crecimiento del 333% de su biomasa inicial, y alcanzó velocidades de 0,64 1/h lo cual es ocho veces más alta que la levadura *Rhodotorula*.

La cinética de crecimiento de esta levadura no ha sido muy estudiada en el campo de investigación de microorganismos, ya que su principal campo de estudio es la producción de pigmentos carotenoides.

## 5. Conclusiones

Se puede llegar a la conclusión de que la cepa de *Rhodotorula* utilizada en este estudio, tiende a tener mejores rendimientos al utilizar densidades celulares de inóculo bajas ( $10^6$  UFC/mL) y temperatura de 28 °C. Esto es de mucha utilidad, ya que los metabolitos que produce la levadura son de gran potencial en la industria química. Se debe seguir trabajando por esta línea, y explotar al máximo las capacidades que tienen este tipo de levaduras oleofílicas.

El modelo cinético que mejor se ajustó a los datos obtenidos fue el de Contois, por lo tanto, se puede concluir que la *Rhodotorula sp.* Utilizada en el presente trabajo, tiene una velocidad de crecimiento baja, rendimiento de consumo de sustrato bajos. Una de las razones por la que tiene estas características, es una posible inhibición por biomasa.

## **6. Recomendaciones**

Al trabajar con las cepas de *Rhodotorula*, se debe tener cuidado al momento de realizar las siembras en caja, ya que tienden a contaminarse con facilidad.

Al momento de realizar el procedimiento de peso seco, se recomienda utilizar una temperatura baja al momento de llevar a cabo la etapa de centrifugación.

Se deben realizar más estudios, variando otras variables importantes como el pH, oxígeno disuelto, variación de fuentes de carbono y nitrógeno.

Se propone desarrollar los experimentos con un método de alimentación diferente, dado el bajo consumo de sustrato que se evidenció en este estudio.

### Referencias Bibliográficas

- Alarcón, M., Quinzo, J. (2018). “Formulación de un proceso para la obtención de colorante orgánico a partir de las flores de sangorache (*Amarantus quitensis*), para ser usado como aditivo en la producción de yogurt y salchichas”. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Universidad en Riobamba. Riobamba, Ecuador.
- Gómez, E. (2016). “Colorantes naturales, tendencias en alimentación y consumo”. Centro tecnológico AINIA. España.
- López, J. A. (2018). “Bioproducción de pigmentos carotenoides y micosporina-glutaminol-glucósido en *Rhodotorula* sp. bajo diferentes espectros de radiación ultravioleta”. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Mussagy, C. U., Carizia, A. A., Ferreira, L. V., Winterburn, J., Santos-Ebinuma, V. de C., Brandão, J. F. (2021). “Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186.” *Biochemical Engineering Journal*, Volume 165.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2013). “High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production”. *Food Microbiology*. Volume 33.
- Pollegioni, L., Langkau, B., Tischer, W., Ghisla, S., Pilone, M. S. (1993). “Kinetic mechanism of D-amino acid oxidases from *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*”. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 268, Issue 19, Pages 13850-13857, ISSN 0021-9258.
- Toro, D. (2004). “La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir”. Universidad de Caldas. *Revista Luna Azul*, ISSN 1909-2474. Manizales, Colombia.

- Pan, J. G., Rhee, J. S. (2003). “Kinetic and energetic analyses of lipid accumulation in batch culture of *Rhodotorula glutinis*”. Department of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology. Journal of Fermentation Technology. Seoul, Corea.
- Hernández, A., Montañez, J., Martínez, C., Rodríguez, R., Aguilar, C. (2014). “Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation”. Food Bioscience. México.
- Griffin, M. E. (1978). “A kinetic analysis of d-xylose transport in *Rhodotorula glutinis*”. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. Hughes Laboratories, Department of Chemistry, Miami University, Oxford, Ohio. USA.
- Arellano, M. E. (2012) “Producción de pigmentos fúngicos (*Monascus purpureus* 2955)”. Saltillo, Coahuila. México.
- Yadav, S., Manjunatha, K. H., Ramachandra, B., Suchitra, N. (2014). “Characterization of pigment producing *Rhodotorula* from dairy environmental samples”. Asian Journal of Dairying & Foods Research, vol. 33, pp. 1-4. India.
- Moline, M., Libkind, D., Flores, M. R., Diéguez, M. C., Farías, M. E., Broock, M. V. (2010) “Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin”. Photochemical & Photobiological Sciences. Argentina.
- Hernández, A. Y., Alva, D. L., Balagurusamy, N. (2021). “Manual de técnicas empleadas para la caracterización de metabolitos producidos por *Rhodotorula glutinis*, Torreón, Coahuila”. Coahuila, México.

Tioni, J., Rakariyatham, N., Deming, R. L. (2005). "Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate". *Process Biochemistry*, vol. 40, nº 70, pp. 2551-2557. California State University, Fullerton, USA.

Castoria, R., Morena, V., Caputo, L., Panfili, G., Curtis, F., Cicco, V. (2007). "Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples". *Phytopathology*. ISSN:1943-7684.

Gargi, G., Sharma, R. (2020). "Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach". *Biotechnology Reports*, vol. 25, p. e00407. Panjab University, Chandigarh, India.

Kot, A., Blazejak, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Piwowarek, K., Brzezinska, R. (2020). "Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 26. Warsaw, Poland.

Pico, S. M. (2018). "Análisis de azúcares e HMF en alimentos (GOMEAZ.01)".

Michelon, M., de Matos de Borba, T., da Silva Rafael, R. et al. (2012). "Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption". *Food Sci Biotechnol*.

- Tkacova, J., Klemková, T., Certík, M. (2018). “Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in  $\beta$ -carotene producing *Rhodotorula glutinis*. Chemical Papers”. ISSN: 0366-6352. Slovak University of Biotechnology, Bratislava, Slovak Republic.
- Taskin, M., Sisman, T., Erdal, S. et al. (2011). “Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5”. *Eur Food Res Technol* 233, 657–665.
- Lau, W. X., Carvajal, O., Nolasco, C., Mizuno, K., et al. (2018). “Production of pigments by *Rhodotorula mucilaginosa*”. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 14(4) Special Issue 2018, pp 344-350. India.
- Nagaraj, Y.N.; Burkina, V.; Okmane, L.; Blomqvist, J.; Rapoport, A.; Sandgren, M.; Pickova, J.; Sampels, S.; Passoth, V. (2022). “Identification, Quantification and Kinetic Study of Carotenoids and Lipids in *Rhodotorula toruloides* CBS 14 Cultivated on Wheat Straw Hydrolysate”. *Fermentation* 2022, 8, 300.
- Rios, Y. (2012). “Espectroscopía UV-Visible” Cuernavaca, México.
- Cheng, Y.T., Yang, C.F. (2016). “Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes”. Department of Safety Health and Environmental Engineering, National Yunlin University of Science and Technology, Yunlin, Taiwan.
- Z. Aksu, A. Tuğba Eren, «Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source,» *Process Biochemistry*, Volume 40, Issue 9, 2005, Pages 2985-2991.

## Apéndices

### Apéndice A. Diluciones seriadas y siembra por extensión.

En relación al conteo de colonias, para conocer la población del microorganismo en las diferentes fases del proceso, se prepararon diluciones seriadas, en agua peptonada, de muestras de inóculo y fermentación, como muestra la Figura 18, de las cuales fueron posteriormente tomados 200µL y sembrados por extensión en un medio de cultivo PDA, para incubarse a 30°C durante 48 horas, como se muestra en la caja petri ilustrada en la Figura 20.

### Figura 18

*Diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .*



### Apéndice B. Cálculo de unidades formadoras de colonia (UFC)

Las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) fue una medida que se utilizó para conocer la población de la levadura y verificar su crecimiento en el proceso de fermentación. Para ello, se hizo conteo de UFC en la caja petri, que se muestra en la Figura 19,

para cada uno de los casos de estudio y posterior a ello, se realizó un cálculo, utilizando la Ec. 9 para obtener el resultado de la población en la fase del proceso requerida.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\#Colonias * Dilución}{Volumen de dilución} \quad (Ec. 9)$$

### Figura 19

*Siembra por extensión de una dilución seriada, después de 48 horas en incubación.*



### Apéndice C. Determinación del crecimiento celular en la fermentación.

La densidad óptica fue la medida que se utilizó para bosquejar el crecimiento celular a lo largo de la fermentación en los casos de estudio, bajo las condiciones propuestas, por lo que, para tener valores más confiables, se tomaron 5 muestras, en las horas previstas para muestreo, en cada fermentación, las cuales fueron sometidas a espectrofotometría a 600nm y así determinar su valor. Estos datos están consignados de la Tabla 8 a la Tabla 16.

**Tabla 8***Densidad óptica a temperatura de 25°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>6</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0800	0,0810	0,0790	0,0740	0,0680	0,0764	0,0764	
1	0	0,0800	0,0920	0,0840	0,0850	0,0850	0,0852	0,0852	0,0088
1	4	0,0830	0,0840	0,0870	0,0880	0,0840	0,0852	0,0852	0,0088
1	8	0,0950	0,0980	0,0970	0,1010	0,0960	0,0974	0,0974	0,0210
1	12	0,1420	0,1560	0,1500	0,1610	0,1610	0,1523	0,1523	0,0759
1	16	0,2660	0,2730	0,2660	0,2470	0,2720	0,2648	0,2648	0,1884
1	20	0,4280	0,4250	0,4260	0,4170	0,4170	0,4240	0,4240	0,3476
1	24	0,5440	0,5510	0,5420	0,5320	0,5320	0,5423	0,5423	0,4659
1	28	0,6190	0,6120	0,6110	0,6010	0,6010	0,6108	0,6108	0,5344
1	32	0,7770	0,7840	0,7430	0,7770	0,7430	0,7680	0,7680	0,6916
1	36	0,7140	0,7270	0,7020	0,6940	0,6940	0,7093	0,7093	0,6329
1	44	0,8040	0,7890	0,7680	0,7480	0,7510	0,7720	0,7720	0,6956
1	52	0,9070	0,9000	0,8940	0,8840	0,8840	0,8963	0,8963	0,8199
2	60	0,5470	0,5280	0,5390	0,5470	0,5320	0,5386	1,0772	1,0008

**Tabla 9***Densidad óptica a temperatura de 25°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>7</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0800	0,0810	0,0790	0,0740	0,0680	0,0764	0,0764	
1	0	0,0880	0,0920	0,0860	0,0840	0,0940	0,0888	0,0888	0,0124
1	4	0,1160	0,1220	0,1180	0,1140	0,1170	0,1174	0,1174	0,0410
1	8	0,2260	0,2190	0,2210	0,2180	0,2180	0,2210	0,2210	0,1446
1	12	0,4000	0,3900	0,3870	0,3860	0,3870	0,3900	0,3900	0,3136
1	16	0,4680	0,4770	0,4610	0,4460	0,4460	0,4630	0,4630	0,3866
1	20	0,5360	0,5490	0,5470	0,5300	0,5300	0,5405	0,5405	0,4641
1	24	0,5720	0,5660	0,5740	0,5610	0,5410	0,5628	0,5628	0,4864
1	28	0,6400	0,6390	0,6140	0,6070	0,6070	0,6250	0,6250	0,5486
1	32	0,6150	0,6560	0,6150	0,6780	0,6780	0,6410	0,6410	0,5646
1	36	0,7160	0,7100	0,7050	0,6950	0,6950	0,7065	0,7065	0,6301
2	44	0,4070	0,3890	0,3930	0,3740	0,3890	0,3904	0,7808	0,7044
2	52	0,4390	0,4450	0,4510	0,4390	0,4380	0,4424	0,8848	0,8084
2	60	0,5400	0,5440	0,5250	0,5440	0,5270	0,5360	1,0720	0,9956

**Tabla 10***Densidad óptica a temperatura de 25°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>8</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0750	0,0750	0,0760	0,0850	0,0800	0,0782	0,0782	
1	0	0,3680	0,3670	0,3630	0,3550	0,3200	0,3546	0,3546	0,2764
1	4	0,4180	0,4440	0,4510	0,4380	0,4240	0,4350	0,4350	0,3568
1	8	0,5490	0,5440	0,5320	0,5230	0,5230	0,5370	0,5370	0,4588
1	12	0,6380	0,6290	0,6380	0,6330	0,6380	0,6352	0,6352	0,5570
1	16	0,7470	0,7500	0,7580	0,7430	0,7420	0,7480	0,7480	0,6698
1	20	0,8570	0,8800	0,8550	0,8260	0,8020	0,8440	0,8440	0,7658
1	24	0,9190	0,9220	0,9300	0,9580	0,9580	0,9323	0,9323	0,8541
2	28	0,5860	0,5920	0,5980	0,6090	0,6030	0,5976	1,1952	1,1170
2	32	0,6390	0,6400	0,6380	0,6350	0,6480	0,6400	1,2800	1,2018
2	36	0,7140	0,7180	0,7000	0,6840	0,6970	0,7026	1,4052	1,3270
2	44	0,8000	0,7850	0,7950	0,7840	0,8000	0,7928	1,5856	1,5074
2	52	0,8910	0,9180	0,8500	0,8850	0,8720	0,8832	1,7664	1,6882
3	60	0,6640	0,6550	0,6520	0,6200	0,6260	0,6434	1,9302	1,8520

**Tabla 11***Densidad óptica a temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>6</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0800	0,0810	0,0790	0,0740	0,0680	0,0764	0,0764	
1	0	0,0780	0,0820	0,0790	0,0800	0,0780	0,0794	0,0794	0,0030
1	4	0,0840	0,0850	0,0840	0,0830	0,0760	0,0824	0,0824	0,0060
1	8	0,0940	0,1050	0,0990	0,1020	0,0950	0,0990	0,0990	0,0226
1	12	0,1680	0,1750	0,1730	0,1710	0,1710	0,1718	0,1718	0,0954
1	16	0,3310	0,3600	0,3420	0,3510	0,3510	0,3460	0,3460	0,2696
1	20	0,4890	0,4880	0,4870	0,4720	0,4720	0,4840	0,4840	0,4076
1	24	0,5940	0,5910	0,5840	0,5830	0,5830	0,5880	0,5880	0,5116
1	28	0,7140	0,7160	0,7120	0,7000	0,7000	0,7105	0,7105	0,6341
1	32	0,7970	0,7990	0,7900	0,7810	0,7390	0,7812	0,7812	0,7048
1	36	0,8550	0,8650	0,8650	0,8430	0,8240	0,8504	0,8504	0,7740
2	44	0,6470	0,5850	0,5910	0,5940	0,5730	0,5980	1,1960	1,1196

2	52	0,6300	0,6100	0,6080	0,5730	0,6053	1,2105	1,1341
2	60	0,7110	0,7040	0,6880	0,6830	0,6550	0,6882	1,3764

**Tabla 12**

*Densidad óptica a temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>7</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0750	0,0780	0,0810	0,0820	0,0790	0,0790	0,0790	
1	0	0,1170	0,1140	0,1260	0,1250	0,1000	0,1164	0,1164	0,0374
1	4	0,2220	0,2160	0,2160	0,2110	0,2030	0,2136	0,2136	0,1346
1	8	0,3620	0,3470	0,3690	0,3560	0,3080	0,3484	0,3484	0,2694
1	12	0,4240	0,4300	0,4230	0,4200	0,4130	0,4220	0,4220	0,3430
1	16	0,4640	0,4860	0,4740	0,4590	0,4430	0,4652	0,4652	0,3862
1	20	0,5370	0,5470	0,5460	0,5320	0,5290	0,5382	0,5382	0,4592
1	24	0,5720	0,5760	0,6040	0,5960	0,5960	0,5870	0,5870	0,5080
1	28	0,6530	0,6720	0,6630	0,6520	0,6520	0,6584	0,6584	0,5794
1	32	0,8700	0,8700	0,8920	0,8930	0,8640	0,8778	0,8778	0,7988
2	36	0,4380	0,4280	0,3620	0,3630	0,3630	0,3978	0,7955	0,7165
2	44	0,5200	0,5270	0,5130	0,5050	0,5050	0,5163	1,0325	0,9535
2	52	0,5870	0,5820	0,5850	0,5870	0,5790	0,5840	1,1680	1,0890
2	60	0,6350	0,6370	0,6350	0,6410	0,6310	0,6358	1,2716	1,1926

**Tabla 13**

*Densidad óptica a temperatura de 28°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>8</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0800	0,0810	0,0790	0,0740	0,0680	0,0764	0,0764	
1	0	0,1440	0,1480	0,1540	0,1460	0,1460	0,1480	0,1480	0,0716
1	4	0,2560	0,2500	0,2530	0,2560	0,2420	0,2514	0,2514	0,1750
1	8	0,3920	0,3870	0,3770	0,3760	0,3800	0,3824	0,3824	0,3060
1	12	0,5090	0,5110	0,5100	0,4950	0,4950	0,5063	0,5063	0,4299
1	16	0,6170	0,6220	0,6140	0,6030	0,6030	0,6140	0,6140	0,5376
1	20	0,6920	0,6880	0,6840	0,6750	0,6750	0,6848	0,6848	0,6084
1	24	0,7860	0,7800	0,7770	0,7580	0,7420	0,7686	0,7686	0,6922
1	28	0,8730	0,8450	0,8440	0,8580	0,8190	0,8478	0,8478	0,7714
2	32	0,5270	0,5090	0,5380	0,5300	0,5430	0,5294	1,0588	0,9824

2	36	0,5660	0,5260	0,5590	0,5590	0,5270	0,5474	1,0948	1,0184
2	44	0,5970	0,5750	0,5900	0,5820	0,5470	0,5782	1,1564	1,0800
2	52	0,7310	0,7140	0,7080	0,7090	0,6910	0,7106	1,4212	1,3448
2	60	0,7360	0,7630	0,7770	0,7660	0,7770	0,7638	1,5276	1,4512

**Tabla 14**

*Densidad óptica a temperatura de 30°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>6</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0730	0,0760	0,0770	0,0740	0,0790	0,0758	0,0758	
1	0	0,0740	0,0770	0,0760	0,0750	0,0750	0,0755	0,0755	0,0003
1	4	0,0800	0,0790	0,0760	0,0790	0,0760	0,0780	0,0780	0,0022
1	8	0,1000	0,1050	0,1110	0,1080	0,0980	0,1044	0,1044	0,0286
1	12	0,2120	0,2120	0,2130	0,2160	0,2050	0,2116	0,2116	0,1358
1	16	0,3560	0,3510	0,3490	0,3650	0,3650	0,3553	0,3553	0,2795
1	20	0,4660	0,4770	0,4680	0,4640	0,4640	0,4688	0,4688	0,3930
1	24	0,5060	0,5170	0,5170	0,5040	0,5040	0,5110	0,5110	0,4352
1	28	0,5660	0,5870	0,5650	0,5680	0,5440	0,5660	0,5660	0,4902
1	32	0,7920	0,8010	0,7840	0,8010	0,7840	0,7924	0,7924	0,7166
2	36	0,3820	0,3570	0,3570	0,3800	0,3590	0,3670	0,7340	0,6582
2	44	0,4620	0,4420	0,4390	0,4130	0,4220	0,4356	0,8712	0,7954
2	52	0,4780	0,4590	0,4550	0,4600	0,4600	0,4630	0,9260	0,8502
2	60	0,4680	0,4650	0,4620	0,4700	0,4450	0,4620	0,9240	0,8482

**Tabla 15**

*Densidad óptica a temperatura de 30°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>7</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0750	0,0750	0,0760	0,0850	0,0800	0,0782	0,0782	
1	0	0,3140	0,3190	0,3160	0,3060	0,3060	0,3138	0,3138	0,2356
1	4	0,4000	0,4020	0,4070	0,3930	0,3930	0,4005	0,4005	0,3223
1	8	0,6060	0,5860	0,6020	0,6050	0,6050	0,5998	0,5998	0,5216
1	12	0,7000	0,6650	0,6940	0,6470	0,6430	0,6698	0,6698	0,5916
1	16	0,7210	0,6820	0,6860	0,6890	0,6840	0,6924	0,6924	0,6142
1	20	0,7750	0,7670	0,7570	0,7400	0,7210	0,7520	0,7520	0,6738

1	24	0,8840	0,8820	0,8490	0,8220	0,8220	0,8593	0,8593	0,7811
2	28	0,5280	0,5580	0,5530	0,5060	0,5060	0,5363	1,0725	0,9943
2	32	0,5860	0,5860	0,5890	0,5820	0,5890	0,5864	1,1728	1,0946
2	36	0,6060	0,6030	0,6050	0,6060	0,6190	0,6078	1,2156	1,1374
2	44	0,7800	0,7790	0,7600	0,7630	0,7630	0,7705	1,5410	1,4628
2	52	0,8160	0,8190	0,8240	0,8100	0,8090	0,8156	1,6312	1,5530
3	60	0,5940	0,6180	0,6110	0,6330	0,5980	0,6108	1,8324	1,7542

**Tabla 16**

*Densidad óptica a temperatura de 30°C y densidad celular de inóculo de 10<sup>8</sup>.*

Factor de dilución	Hora	Densidad óptica					DO promedio	Sin dilución	Sin blanco
1	Blanco	0,0750	0,0750	0,0760	0,0850	0,0800	0,0782	0,0782	
1	0	0,4370	0,4290	0,4200	0,4060	0,3730	0,4130	0,4130	0,3348
1	4	0,5210	0,5350	0,5080	0,5180	0,4850	0,5134	0,5134	0,4352
1	8	0,6160	0,6160	0,6080	0,6190	0,6080	0,6134	0,6134	0,5352
1	12	0,6920	0,6780	0,6840	0,6840	0,6684	0,6813	0,6813	0,6031
1	16	0,7050	0,7240	0,7000	0,6840	0,6840	0,7033	0,7033	0,6251
1	20	0,7950	0,8090	0,8000	0,7960	0,7960	0,8000	0,8000	0,7218
1	24	0,8240	0,8140	0,8290	0,8200	0,8190	0,8212	0,8212	0,7430
1	28	0,8770	0,8810	0,8740	0,8730	0,8630	0,8736	0,8736	0,7954
2	32	0,5610	0,5360	0,5480	0,5320	0,5060	0,5366	1,0732	0,9950
2	36	0,5620	0,5910	0,5860	0,5610	0,5600	0,5720	1,1440	1,0658
2	44	0,7450	0,7900	0,7880	0,7570	0,7370	0,7634	1,5268	1,4486
3	52	0,6020	0,6170	0,6010	0,5930	0,5680	0,5962	1,7886	1,7104
3	60	0,6260	0,6230	0,5860	0,6200	0,6000	0,6110	1,8330	1,7548

#### **Apéndice D.** Determinación de la velocidad de crecimiento.

A los datos de biomasa, se le aplicará el logaritmo neperiano para observar de una manera más asertiva la zona exponencial para calcular la velocidad de crecimiento

**Tabla 17**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 25°C; Densidad inóculo 10<sup>6</sup>*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,0088	0,8724	-0,1365
4	0,0088	0,8724	-0,1365
8	0,0210	0,8901	-0,1164
12	0,0759	0,9697	-0,0307
16	0,1884	1,1331	0,1250
20	0,3476	1,3643	0,3106
24	0,4659	1,5359	0,4291
28	0,5344	1,6354	0,4919
32	0,6916	1,8637	0,6226
36	0,6329	1,7784	0,5757
44	0,6956	1,8695	0,6257
52	0,8199	2,0499	0,7178
60	1,0008	2,3126	0,8384

**Tabla 18**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 25°C; Densidad inóculo  $10^7$*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,0124	0,8776	-0,1305
4	0,0410	0,9191	-0,0843
8	0,1446	1,0695	0,0672
12	0,3136	1,3149	0,2738
16	0,3866	1,4209	0,3513
20	0,4641	1,5334	0,4275
24	0,4864	1,5658	0,4484
28	0,5486	1,6561	0,5044
32	0,5646	1,6793	0,5184
36	0,6301	1,7744	0,5735
44	0,7044	1,8823	0,6325
52	0,8084	2,0332	0,7096
60	0,9956	2,3050	0,8351

**Tabla 19**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 25°C; Densidad inóculo  $10^8$*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,2764	1,2609	0,2318
4	0,3568	1,3776	0,3204
8	0,4588	1,5257	0,4225
12	0,5570	1,6683	0,5118
16	0,6698	1,8320	0,6054
20	0,7658	1,9714	0,6787
24	0,8541	2,0995	0,7417
28	1,1170	2,4813	0,9088
32	1,2018	2,6044	0,9572
36	1,3270	2,7861	1,0247
44	1,5074	3,0481	1,1145
52	1,6882	3,3105	1,1971
60	1,8520	3,5483	1,2665

**Tabla 20**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 28°C; Densidad inóculo 10<sup>6</sup>*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,0030	0,8640	-0,1462
4	0,0060	0,8683	-0,1412
8	0,0226	0,8924	-0,1138
12	0,0954	0,9980	-0,0020
16	0,2696	1,2510	0,2240
20	0,4076	1,4514	0,3725
24	0,5116	1,6024	0,4715
28	0,6341	1,7802	0,5767
32	0,7048	1,8828	0,6328
36	0,7740	1,9833	0,6848
44	1,1196	2,4850	0,9103
52	1,1341	2,5061	0,9187
60	1,3000	2,7470	1,0105

**Tabla 21**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 28°C; Densidad inóculo 10<sup>7</sup>*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,0374	0,9139	-0,0900
4	0,1346	1,0550	0,0536
8	0,2694	1,2507	0,2237
12	0,3430	1,3576	0,3057
16	0,3862	1,4203	0,3509
20	0,4592	1,5263	0,4228
24	0,5080	1,5971	0,4682
28	0,5794	1,7008	0,5311
32	0,7988	2,0193	0,7028
36	0,7165	1,8998	0,6418
44	0,9535	2,2439	0,8082
52	1,0890	2,4406	0,8923
60	1,1926	2,5910	0,9521

**Tabla 22**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 28°C; Densidad inóculo 10<sup>8</sup>*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,0716	0,9636	-0,0371
4	0,1750	1,1137	0,1077
8	0,3060	1,3039	0,2653
12	0,4299	1,4837	0,3945
16	0,5376	1,6401	0,4948
20	0,6084	1,7428	0,5555
24	0,6922	1,8645	0,6230
28	0,7714	1,9795	0,6829
32	0,9824	2,2859	0,8267
36	1,0184	2,3381	0,8493
44	1,0800	2,4276	0,8869
52	1,3448	2,8120	1,0339
60	1,4512	2,9665	1,0874

**Tabla 23**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 30°C; Densidad inóculo 10<sup>6</sup>*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	-0,0003	0,8592	-0,1518
4	0,0022	0,8628	-0,1476
8	0,0286	0,9011	-0,1041
12	0,1358	1,0568	0,0552
16	0,2795	1,2653	0,2353
20	0,3930	1,4301	0,3577
24	0,4352	1,4914	0,3997
28	0,4902	1,5713	0,4519
32	0,7166	1,9000	0,6418
36	0,6582	1,8152	0,5962
44	0,7954	2,0144	0,7003
52	0,8502	2,0939	0,7390
60	0,8482	2,0910	0,7377

**Tabla 24**

*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 30°C; Densidad inóculo  $10^7$*

Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,2356	1,2016	0,1836
4	0,3223	1,3275	0,2833
8	0,5216	1,6168	0,4804
12	0,5916	1,7185	0,5414
16	0,6142	1,7513	0,5604
20	0,6738	1,8378	0,6086
24	0,7811	1,9935	0,6899
28	0,9943	2,3031	0,8343
32	1,0946	2,4488	0,8956
36	1,1374	2,5109	0,9206
44	1,4628	2,9833	1,0930
52	1,5530	3,1143	1,1360
60	1,7542	3,4064	1,2256

**Tabla 25**

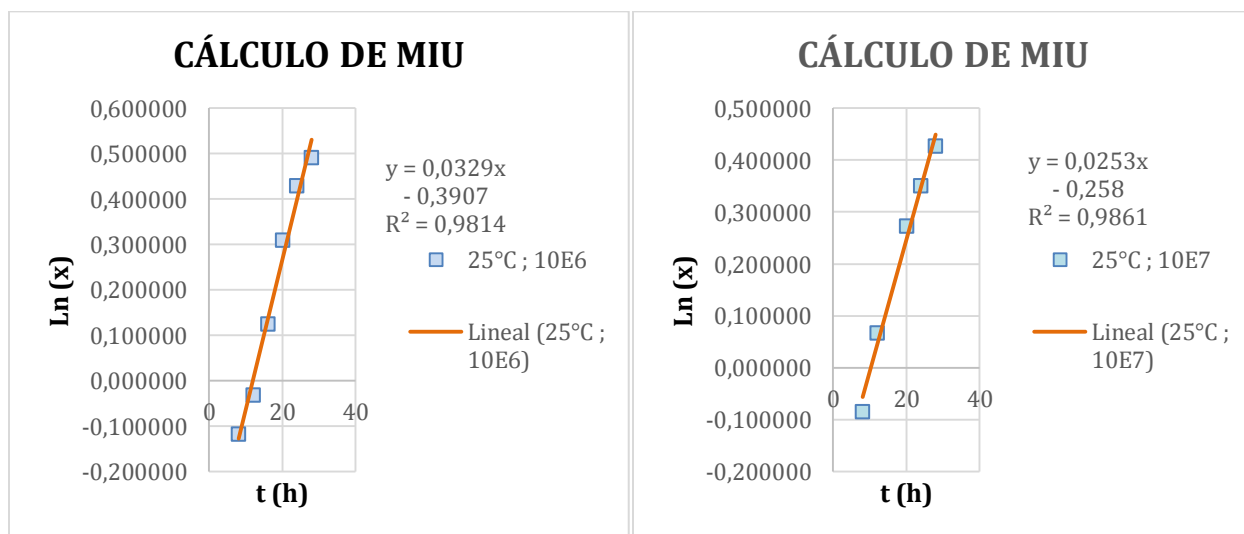
*Logaritmo neperiano de biomasa. Temperatura: 30°C; Densidad inóculo  $10^8$*

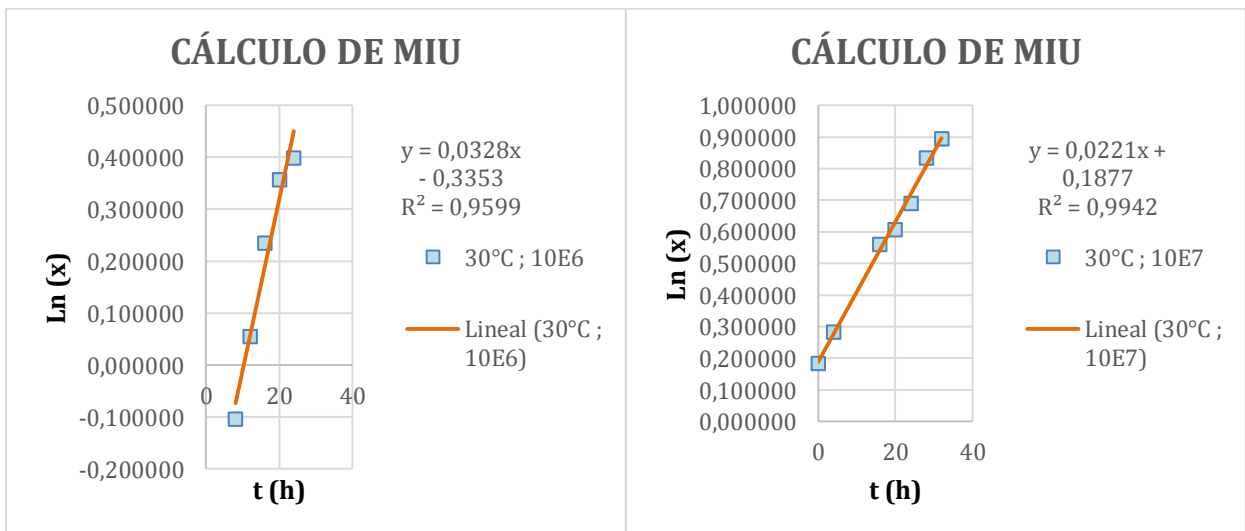
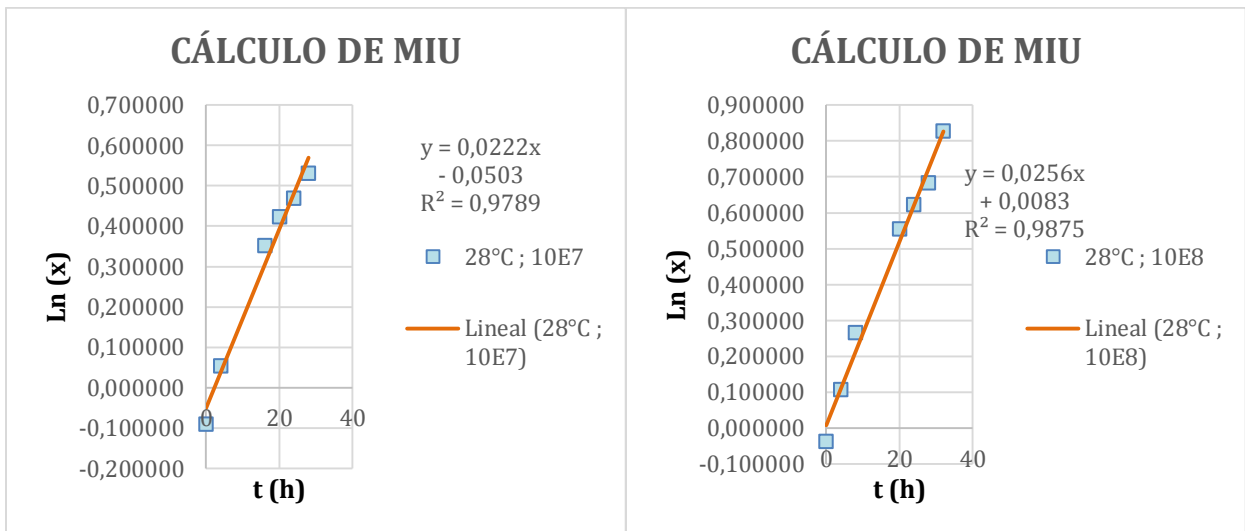
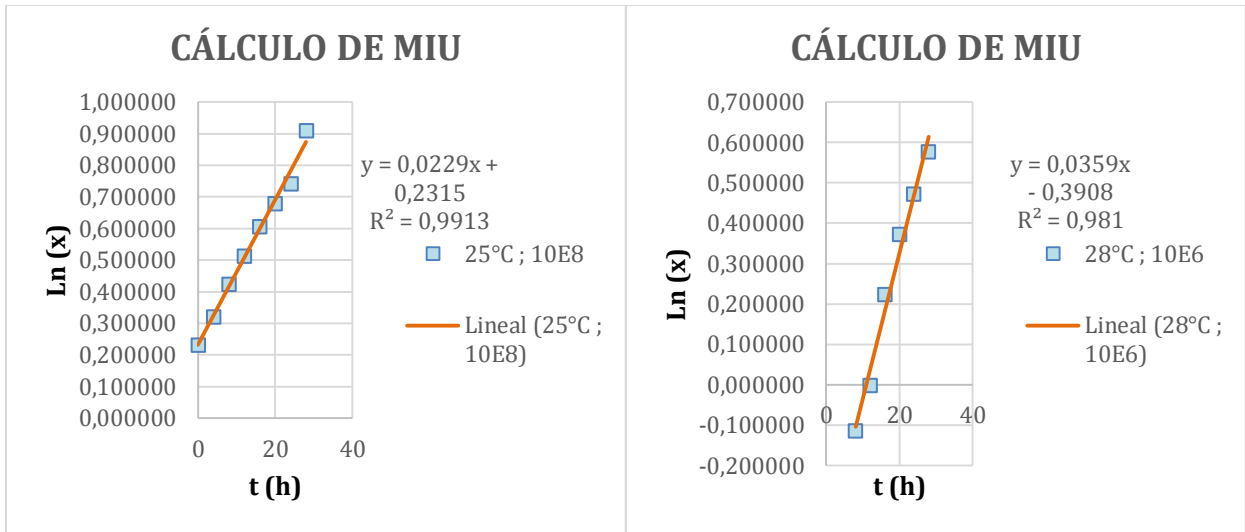
Hora	Densidad óptica	Biomasa (X) [g/L]	LN (X)
0	0,3348	1,3457	0,2969
4	0,4352	1,4914	0,3997
8	0,5352	1,6366	0,4926
12	0,6031	1,7352	0,5511
16	0,6251	1,7671	0,5693
20	0,7218	1,9075	0,6458
24	0,7430	1,9383	0,6618
28	0,7954	2,0144	0,7003
32	0,9950	2,3042	0,8347
36	1,0658	2,4069	0,8784
44	1,4486	2,9627	1,0861
52	1,7104	3,3428	1,2068
60	1,7548	3,4072	1,2259

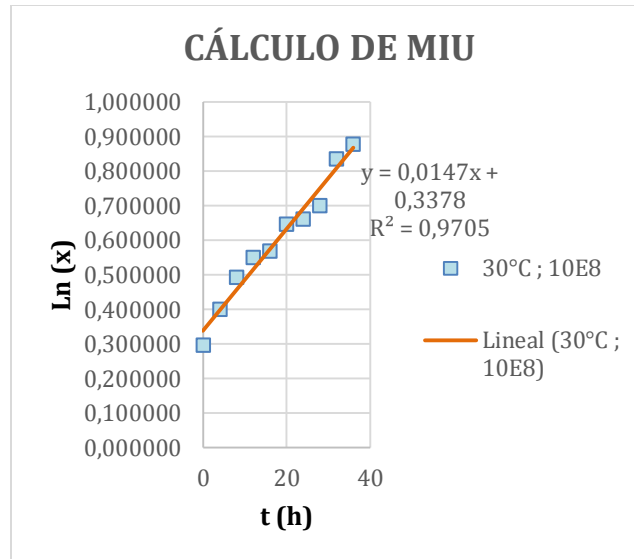
Los gráficos que se construyeron para estimar la velocidad máxima de crecimiento para cada uno de los experimentos están expuestos en la Figura 20, con las ecuaciones respectivas de cada curva de crecimiento.

**Figura 20**

*Crecimiento microbiano en la fase exponencial de cada experimento.*







### Apéndice E. Modelos cinéticos.

La programación que se utilizó para determinar parámetros cinéticos en el software MATLAB se describe a continuación.

```
function dy=EcuacionesBatch(~,xc)
global Um Yxs ms Xmax %Ypx mp; %Las constantes de las ecuaciones
dy=zeros(2,1);
X=xc(1); S=xc(2);

%u=(Um)*(1-exp(-S/ks)); %Tessier
%u=(Um*S)/(ks+S); %Monod
%u=(Um*S)/((ks*X)+S); %Contois
%u=(Um*(S^2))/((ks*X)+(S^2)); %Mosser
u=(Um*X*(1-(X/Xmax)))

dy(1)=(u)*X;
dy(2)=- (u/Yxs+ms)*X;
%dy(3)=(Ypx*u+mp)*X;
End
```

Además, la codificación del sistema solver se encuentra a continuación.

```
function fu=objbio(x)
```

```

global Um Yxs ms Xmax;

Um=x(1); Yxs=x(3); ms=x(4); Xmax=x(2);

filename='Datos.xlsx';
sheet=1;
xlRange='C7:D13';
D=xlsread(filename,sheet,xlRange);

[t,xc]=ode45('EcuacionesBatch',(8:4:32),[1.1067 15.9800]);

Bio=zeros(7,1);
Sus=zeros(7,1);
for i=1:7

    Bio(i)=D(i,1);
    Sus(i)=D(i,2);
end

DesRB=0;
DesSB=0;

for i=1:7
    DesRB=DesRB+100*(abs(D(i,1)-xc(i,1))/D(i,1));
    DesSB=DesSB+100*(abs(D(i,2)-xc(i,2))/D(i,2));
end

ERB=(DesRB)/(7);
ESB=(DesSB)/(7);

close all

figure;
subplot(2,2,1);plot(t,Bio,'*r');
xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Concentración de biomasa (g/L)');
text(1,3,['Error=',num2str(ERB)]);
hold on
plot(t,xc(:,1),'r');

subplot(2,2,2);plot(t,Sus,'*b');
hold on
plot(t,xc(:,2),'b');
xlabel('Tiempo (h)');
ylabel('Concentración de Sustrato (g/L)');
text(1,4,['Error=', num2str(ESB)]);

fu=(ERB+ESB)/2

end

```

Por otro lado, con el fin de obtener los resultados, se utilizó la siguiente programación.

```
clear all
close all
clc

Umo=0.044; kso=4.29; Yxso=0.1197; mso=0.000; Xmaxo=2,4436;

UmL=0.01; YxsL=0.092; msL=-0.001; XmaxL=2;
UmU=5; YxsU=1; msU=0.100; XmaxU=3;

xo=[Umo;kso;Yxso;mso];

A=[];
B=[];

Aeq=[];
Beq=[];

lb=[UmL;XmaxL;YxsL;msL];
ub=[UmU;XmaxU;YxsU;msU];
options=optimset('Algorithm','interior-point','TolFun',1e-6,'MaxIter',1000);
[x,fval]=fmincon('objbio',xo,A,B,Aeq,Beq,lb,ub,[],options);

disp('x');
disp(x);

disp('fval');
disp(fval);
```