

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

TEMA:

“Metodología de producción de microorganismos como inóculo para las destilerías de la provincia de Pastaza”

AUTOR/A:

TUQUERRES CURIPALLO DENISSE LIZBETH

DIRECTORES:

KARINA CARRERA PH. D.

ING. VÍCTOR CERDA MSC.

PASTAZA – ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Denisse Lizbeth Tuquerres Curipallo, con C.I: 160069322-8, certifico que los criterios y opiniones que constan en el Proyecto de Investigación bajo el tema: “**Metodología de producción de microorganismos como inóculo para las destilerías de la provincia de Pastaza**”, son de mi autoría y exclusiva responsabilidad.

Denisse Lizbeth Tuquerres Curipallo
160069322-8

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, Yo Karina Carrera Sánchez con C.I: 160025928-5 y Víctor Cerda Mejía con C.I: 180285002-2 certifico que la egresada Denisse Lizbeth Tuquerres Curipallo, realizó el Proyecto de Investigación titulado: **“Metodología de producción de microorganismos como inóculo para las destilerías de la provincia de Pastaza”**, previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial bajo nuestra supervisión.

Karina Carrera Ph. D.

Ing. Víctor Cerda MsC.

DIRECTORES DEL PROYECTO

CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El proyecto de Investigación titulado: **“Metodología de producción de microorganismos como inóculo para las destilerías de la provincia de Pastaza”**, fue aprobado por los siguientes miembros de tribunal.

Dr. Manuel Pérez Quintana
PRESIDENTE

MSc. Paulina Ulloa
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MSc. Paúl Manobanda
MIEMBRO DE TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por darme todo lo necesario para lograr mis metas y por todas las enseñanzas y oportunidades que me da cada día.

A mis Padres Luis y Martha por ser el pilar fundamental en mi vida y mi carrera profesional que con su amor y apoyo me han formado e inculcado los valores de disciplina y respeto y que con constante sacrificio me han forjado el camino para seguir adelante.

A mi esposo Jairo por su apoyo, su paciencia y comprensión en esta etapa de mi vida y por estar siempre al pendiente de mí.

A mis hermanos Henry y Aracely por brindarme su apoyo y compartirme enseñanzas en cada momento y por estar siempre a mi lado en cada uno de mis logros y tropiezos.

A mis tutores por su conocimiento, paciencia, compromiso y apoyo durante toda mi carrera Universitaria.

A mis amigos/as Valeria, Morelia, Carmen, Aykel, Jhonjairo, Braulio, Robinson y Gonzalo que durante estos 5 años compartimos una etapa extraordinaria en nuestras vidas, aprendiendo nuevas cosas y apoyándonos cada uno de nosotros.

A esta prestigiosa Universidad la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como profesionales con responsabilidad y rigor académico.

Gracias a todos...

DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo a Dios por cuidarme y protegerme, darme sabiduría y entendimiento, por fortalecerme y permitirme alcanzar un logro más en mi vida.

A mis Padres Luis y Martha que siempre me apoyan incondicionalmente y me brindan su amor, su confianza y sus consejos, sobre todo por su paciencia, todo lo que hoy soy es gracias a ellos.

A mis dos hijos Melany y Ariel que son la razón de mi vida y mi mayor motivación para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para ellos.

A mi esposo Jairo por su respaldo y quien formó parte de mi sacrificio y me demostró su amor y confianza

A mis amigos por su apoyo incondicional, por darme ánimos a seguir adelante y llegar hasta el final.

A mis docentes y tutores en especial a mi asesor Amaury Pérez por estar siempre brindándome su conocimiento, guiándome y ayudando durante la realización del proyecto y lograr cumplir mi meta tan anhelada.

Denisse Tuquerres

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad obtener una metodología de producción de microorganismos (levaduras) para su aplicación como inóculo en las destilerías de la provincia de Pastaza. Se caracterizaron las levaduras que son utilizadas para la producción de bebidas alcohólicas, en la elaboración de productos panificables y las que son utilizadas para otros fines industriales. Además, se recuperaron diferentes artículos científicos que en su contenido se mencionan sobre varias metodologías que producen microorganismos tanto a nivel de laboratorio, como a nivel industrial. Se realizó la vigilancia tecnológica donde se definieron los criterios bibliométricos y cienciométricos para la selección de los artículos científicos que se obtuvieron acerca de la propuesta metodológicas para la producción de levaduras en la producción de etanol. Posteriormente se propuso una metodología que cumple con las características que existen dentro del contexto de la Amazonía y que son apropiadas en referencia con la utilización de la materia prima (caña de azúcar). Por último, se describió la etapa metodológica del mecanismo de obtención de levaduras en la etapa de fermentación del etanol.

Palabras clave: Producción, fermentación, levaduras, metodologías, etanol, *Saccharomyces*.

ABSTRACT

The purpose of this work is to obtain a methodology for the production of microorganisms (yeast) for its application as inoculum in the distilleries of the province of Pastaza. The yeasts that are used for the production of alcoholic beverages, in the elaboration of bread products and those that are used for other industrial purposes were characterized. In addition, different scientific articles were recovered that mention various methodologies that produce microorganisms both at the laboratory level and at the industrial level. Technological surveillance was carried out where bibliometric and scientometric criteria were defined for the selection of the scientific articles that were obtained about the methodological proposal for the production of yeasts in the production of ethanol. Subsequently, a methodology was proposed that meets the characteristics that exist within the context of the Amazon and that are appropriate in reference to the use of raw materials (sugarcane). Finally, the methodological stage of the mechanism for obtaining yeasts in the stage of fermentation of ethanol is described.

Keywords: Production, fermentation, yeasts, methodologies, ethanol, *Saccharomyces*.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN	3
1.1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.2 OBEJTIVO GENERAL	4
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO II	5
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	5
2.1 ANTECEDENTES.....	5
2.2 BASES TEÓRICAS	5
2.2.1 <i>CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS</i>	5
2.2.2 <i>CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL</i>	6
2.2.3 <i>FACTORES A TENER EN CUENTA PARA EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS LEVADURAS</i>	7
2.3 METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE MICROORGANISMOS	7
2.3.1 <i>METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES (BACTERIAS, HONGOS)</i>	8
2.3.2 <i>METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE SALMONELLA</i>	10
2.3.3 <i>METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL A PARTIR DE CAÑA DE AZÚCAR</i>	11
2.4 TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS.....	14
2.4.1 <i>ESCALADO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LEVADURAS</i>	15
2.5 TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. ETAPA DE FERMENTACIÓN	16
2.5.1 <i>SISTEMA CONTINUO</i>	17
2.5.2 <i>SISTEMA DISCONTINUO</i>	18
2.6 VIGILANCIA TECNOLÓGICA	18
2.6.1 <i>BIBLIOMETRÍA Y CIENCIOMETRÍA</i>	20

2.6.2 INDICADORES BIBLIOMÉTRICOS.....	22
CAPITULO III.....	25
3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	25
3.2 LOCALIZACIÓN	25
3.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN	25
3.4 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	25
3.4.1 RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN	26
3.4.2 SELECCIÓN DE INFORMACIÓN	26
3.4.3 CRIBADO DE LAS METODOLOGÍAS	27
3.4.4 CONTEXTUALIZACIÓN	27
3.4.5 DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA METODOLÓGICA	28
CAPÍTULO IV	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1 RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN.....	29
4.2 SELECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	31
4.3 CRIBADO DE LAS METODOLOGÍA	32
4.4 DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA METODOLÓGICA	32
CAPITULO V.....	39
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1 CONCLUSIONES.....	39
5.2 RECOMENDACIONES	39
CAPÍTULO VI	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROCESO DE INOCULACIÓN DE LA MUESTRA EN TUBOS CON MEDIO DE CULTIVO CON AGAR.....	9
FIGURA 2. PROCESO DE INOCULACIÓN DE LA MUESTRA EN PLACA CON MEDIO DE CULTIVO CON AGAR.....	9
FIGURA 3. RESIEMBRA DE LAS COLONIAS AISLADAS	10
FIGURA 4. ESQUEMA DE OBTENCIÓN DE ETANOL DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL ..	13
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE LA VIGILANCIA TECNOLÓGICA	20
FIGURA 6. ESQUEMA DE LA CIENCIOMETRÍA	21
FIGURA 7. DIAGRAMA HEURÍSTICO DE LA METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	26
FIGURA 8. DIAGRAMA HEURÍSTICO PROPUESTO PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS EN EL CONTEXTO DE LA AMAZONIA ECUATORIANA.	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA CIENCIOMÉTRICA Y PARÁMETROS BIBLIOMÉTRICOS 29

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. (Sánchez Riaño, Gutiérrez Morales, Muñoz Hernández, & Rivera Barrero, 2010)

Sin embargo, se ha encontrado que algunos tipos de hongos y levaduras denominadas como no-*Saccharomyces* pueden ser productores de etanol, pero su uso a nivel industrial es aún limitado debido a que no compiten en cuanto a tolerancia a etanol, osmotolerancia y actividad killer con respecto a *Saccharomyces*. (Zumaqué, Mantilla, & Pantoja, 2009)

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante la fermentación, mostrando distintos rendimientos de la producción de etanol. (Pérez, González-Hernández, Chávez-Parga, & Cortés-Penagos, 2013)

La levadura *S. cerevisiae* es probablemente el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo; aunque no se tuviera en un principio conciencia plena de la participación del microorganismo en la elaboración de bebidas alcohólicas. (Jiménez, González, Hernández, & Ojeda, 2014)

La levadura crece simultáneamente con la producción de alcohol por espacio de 20 horas. La velocidad de fermentación aumenta de forma rápida hasta alcanzar el máximo al término de 15 horas. La producción de alcohol continúa entonces a una velocidad decreciente, concluyendo en ciclo de 24 a 30 horas de fermentación, para obtener una concentración final de alcohol de 6 a 7% de volumen. (Suárez-machín, Garrido-carralero, & Guevara-rodríguez, 2016)

Con el fin de contrarrestar los problemas que se presentan en las fermentaciones alcohólicas industriales, debido a la inhibición por etanol, inhibición por sustrato, compuestos tóxicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos y la contaminación microbiana, es necesaria la búsqueda de cepas de levaduras que presenten las características deseables para resistir a tales inhibiciones y que impidan el desarrollo de microorganismos. (García et al., 2017)

La fabricación de etanol por la vía fermentativa o biológica es realizada por microorganismos a través de un proceso fermentativo, que transforma la materia prima (sustrato azucarado) en etanol y CO₂. En esta etapa se lleva a cabo la fermentación de glucosa y una parte de la fructosa en etanol y dióxido de carbono, mediante la levadura que es adicionada al tanque de fermentación junto con los nutrientes necesarios para su reproducción (inoculación) (Yesid, Reyes, Eduardo, & Contreras, 2007)

El etanol es el producto de la fermentación alcohólica efectuada por microorganismos que tienen la capacidad de fermentar la glucosa (Suárez-machín et al., 2016). Dentro de las materias azucaradas más favorables para la fermentación alcohólica está la miel final de caña (melaza). Para países grandes productores de azúcar de caña tiene una importancia primordial la utilización de la miel final como fuente de carbono para la fermentación alcohólica. (Suárez-machín et al., 2016)

Según (Isabel, Rodríguez, Andrés, & Suárez, 2005) las tecnologías para la fermentación son muy similares para diferentes materias primas, los procesos a partir de caña de azúcar son actualmente de mayor aplicación a escala comercial y pueden llevarse a cabo por tres métodos: Lotes, lotes alimentados o en continuo. Dentro de estos modos los reactores *batch* siguen siendo la tecnología de fermentación más utilizada. Aunque los que mayor aplicación han encontrado son los de lotes alimentados, ya que, logran altos rendimientos al incrementar la concentración de las levaduras.

Según García et al., (2017); Ricardo Moreno Virginia Helena Albarracín, (2012); Diana Pachón, Adriana Pulido, & Carlos Moreno, (2011) plantean varias metodologías para el aislamiento de diferentes microorganismos. El diagrama heurístico propuesto en la metodología permitirá llegar a la obtención de una metodología que contenga los criterios y las características apropiadas para la producción de microorganismos (levaduras).

Como lo menciona Escalante-Minakata & Ibarra-Junquera, (2007) el uso de inóculos constituye una herramienta importante para estandarizar y garantizar que el producto conserve aquellas características deseables del etanol.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN

1.1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los problemas que presenta la industria de la destilería en la provincia de Pastaza es que producen etanol a partir de caña de azúcar en condiciones no adecuadas principalmente en la etapa de fermentación con el uso de inóculos, por desconocimiento de su utilidad o por falta de tecnología adecuada para este proceso. Como consecuencia no se producen inóculos apropiados que ayuden a la obtención de etanol en mejores condiciones como producto final.

1.1.2 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación tuvo como finalidad proponer una metodología para la producción de levaduras que se utilizará como inóculo para las destilerías de la provincia de Pastaza, tomando como materia prima el jugo de caña recién extraído, que es un producto principal de las industrias destiladoras de etanol. Además, presentan un elevado contenido en azúcares, fibra y proteínas entre otros compuestos, que le permite ser un excelente sustrato para realizar fermentaciones alcohólicas industriales.

García et al., (2017); Ricardo Moreno Virginia Helena Albarracín, (2012); Diana Pachón, Adriana Pulido, & Carlos Moreno, (2011) plantean varias metodologías para el aislamiento de diferentes microorganismos. El diagrama heurístico propuesto en la metodología permitirá llegar a la obtención de una metodología que contenga los criterios y las características apropiadas para la producción de microorganismos (levaduras).

Como lo menciona Escalante-Minakata & Ibarra-Junquera, (2007) el uso de inóculos constituye una herramienta importante para estandarizar y garantizar que el producto conserve aquellas características deseables del etanol.

1.1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Las destilerías de la provincia de Pastaza no cuentan con el inóculo apropiado para el proceso de fermentación para la obtención de etanol

1.2 OBEJTIVO GENERAL

Proponer una metodología para la producción de levaduras como inóculo para las destilerías de la provincia de Pastaza.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las metodologías para la producción de microorganismos (levaduras).
2. Desarrollar la metodología para la producción de levaduras a partir de los microorganismos identificados en las destilerías de la provincia de Pastaza.

CAPÍTULO II

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 ANTECEDENTES

Según Suárez-machín, Garrido-carralero, & Guevara-rodríguez, (2016) mencionan que los microorganismos (levaduras) han sido utilizadas desde la antigüedad en la elaboración de bebidas alcohólicas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su producción y uso en grandes cantidades de estos microorganismos determinan que son los que llevan a cabo la transformación de los azúcares en etanol, siendo así los más utilizados y estudiados para este tipo de procesos.

Las levaduras de género *Saccharomyces* según Fajardo & Sarmiento, (2007) es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es muy exigente en cuanto a su cultivo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajo niveles de subproductos.

Los inóculos de levaduras son ampliamente utilizados en la industria de las bebidas alcohólicas, sin embargo, se recomienda utilizar cepas autóctonas las cuales están adaptadas a los medios de fermentación de cada área. Se han encontrado muchos géneros de levaduras en fermentaciones, el género *Saccharomyces* es el principal responsable de la fermentación alcohólica, así como de la producción de la mayoría de compuestos aromáticos. (Ruiz, 2011)

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS

Se denomina levaduras a un grupo de hongos unicelulares cuya actividad ha sido siempre de gran importancia, estos microorganismos son abundantes especialmente en donde existe la presencia de azúcares, son de forma esférica, ovalada o cilíndrica (Nieto, 2009).

Las levaduras *Saccharomyces* siempre han alcanzado un crecimiento de al menos 40°C, y es capaz de fermentar hasta 42°C y se ha estudiado principalmente en la producción de etanol e industrias en zonas tropicales. Las cepas de *Saccharomyces* muestran una interesante fermentación, que provoca una degradación del malato hasta en un 40%. Su

concentración inicial, y produciendo altas cantidades de glicerol, ácido succínico y ácido acético. (Rainieri, Zambonelli, Giudici, & Castellari, 1998)

2.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Tanto la producción de levaduras como la de etanol son reacciones exotérmicas, por lo que es necesario que se elimine el calor desprendido en el transcurso de la fermentación y que se mantenga a una temperatura cerca de (33 a 34°C) de lo contrario si la temperatura aumenta puede existir pérdidas en el rendimiento. Se considera un índice apropiado de liberación de calor de 287 kcal de etanol formado. (Suárez-machín et al., 2016)

CLASIFICACIÓN

Las levaduras son microorganismos que se encuentran clasificados dentro de los Ascomicetos, no obstante, las levaduras no forman un grupo muy definido, ya que no son una entidad taxonómica natural que guarda uniformidad morfológica. (Uribe-Gutiérrez & Gutierrez, 2007)

TEMPERATURA

La temperatura óptima de crecimiento se determinó en el medio líquido YPD. Se utiliza una incubadora de gradiente de temperatura construida de acuerdo con este método que permite la determinación del crecimiento celular con temperaturas de 18 a 45°C con un intervalo de 1.5 °C hasta identificar la temperatura máxima de multiplicación celular. En una medida limitada durante las primeras 12 a 18 horas. (Rainieri et al., 1998)

FERMENTACIÓN - pH

La fermentación por levaduras está influenciada por varios factores como la temperatura, pH, concentración de azúcares y otras variables que influyen en el crecimiento de los microorganismos. Este proceso se realiza en condiciones de fermentación con un pH de 4,5 y a una temperatura de 28-30°C. (Zumaqué et al., 2009)

2.2.3 FACTORES A TENER EN CUENTA PARA EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS LEVADURAS

PRESIÓN OSMÓTICA: La nutrición de la levadura es un proceso puramente osmótico, el estrés osmótico puede causar una disminución en el volumen celular que afecta la velocidad de fermentación.

TEMPERATURA: Las altas temperaturas ocasionan una disminución de la biomasa, producto de un descenso en el contenido de proteínas. Las temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo.

DESECACIÓN: Es uno de los principales agentes que inhiben las actividades y desarrollo de los microorganismos.

LUZ: En general la luz es perjudicial para los microorganismos que carecen de clorofila o cualquier otro pigmento que les permite usar la energía de las radiaciones en el proceso de fotosíntesis.

pH: El pH óptimo, en el cual se desarrollan mejor los microorganismos, está entre 4 y 5. Las levaduras tienen la ventaja de soportar medios ácidos más que otros microorganismos lo que es aprovechado en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato.

ALCOHOL: El efecto del etanol en la célula es una combinación de inhibición del crecimiento y disminución de la viabilidad, puede actuar como inhibidor de la fermentación a partir de un 8%. No es recomendable que el alcohol tenga un grado alcohólico muy elevado.

2.3 METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE MICROORGANISMOS

Autores como Ricardo Moreno Virginia; Helena Albarracín, (2012); Diana Pachón et al., (2011); García et al., (2017) plantean diferentes metodologías que han sido utilizadas para la obtención de inóculos y posteriormente los cultivos que son considerados una excelente opción para obtener mejores resultados en el proceso de producción de microorganismos. En la primera metodología se utilizan técnicas que permiten obtener un cultivo puro y luego cultivarlo a mayor escala y con adición de algunos medios de cultivo que han demostrado dar buenos resultados en la recuperación del microorganismo.

En la segunda metodología se realiza el trabajo con microorganismos que tienen poblaciones extensas y homogéneas del microorganismo a estudiar, y en la tercera metodología se realiza el trabajo de aislamiento de microorganismos (levaduras) como inicio, utilizando maleza de caña de azúcar, y tomando como criterio de selección la producción de etanol, resultando ser capaces de tolerar concentraciones de etanol.

2.3.1 METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES (BACTERIAS, HONGOS)

Ricardo Moreno & Virginia Helena Albarracín, (2012) plantean una metodología para la producción de microorganismos que no se realiza con las células aisladas, sino con poblaciones extensas y homogéneas del microorganismo a estudiar. Por lo tanto, se utilizan técnicas que permiten obtener un cultivo puro y luego cultivarlo a mayor escala. Para obtener cultivos puros se han de utilizar instrumentos estériles, es decir, libres de otros microorganismos no deseados (contaminantes). La esterilidad se consigue por diferentes métodos previamente estudiados: calor seco, calor húmedo, filtración, esterilización química, radiación. Para poder estudiar los microorganismos en el laboratorio, el microbiólogo también debe utilizar medios de cultivo que posean los nutrientes necesarios para el crecimiento de los mismos. Si los nutrientes están en forma de solución acuosa hablamos de medios de cultivo líquidos, mientras que, si a esta solución se añaden solidificantes, como la gelatina o el agar (2-3%), obtenemos medios de cultivo sólidos. (Moreno & Albarracín, 2012)

Para aislar un microorganismo de una mezcla de varios y obtener un cultivo puro del mismo, la técnica más utilizada es la de siembra por estría en medio sólido, que permite obtener colonias separadas de individuos que proceden por división de una única célula. Estas colonias nos sirven para iniciar un cultivo a gran escala. Otra técnica consiste en obtener una suspensión de la mezcla de microorganismos y hacer diluciones seriadas que se vierten en una placa Petri hasta conseguir colonias aisladas. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, se puede mantener haciendo resiembras sucesivas o conservando las células en refrigeración empleando un agente conservante, más comúnmente glicerol (10-30%) a -80°C , en nitrógeno líquido a -173°C , o mediante liofilización. (Moreno & Albarracín, 2012)

PROCEDIMIENTO – ESCALA

- Se selecciona la muestra a partir de la cual se realizan los aislamientos, pesar la muestra y colocarla en un tubo de ensayo estéril al cual se le adiciona solución estéril (agua destilada al 0.9% NaCl), se coloca la tapa y se agita hasta homogeneizar el contenido con un agitador.
- Una vez obtenida una muestra homogeneizada, se realiza diluciones seriadas según indica el esquema (Figura 1). Con una micropipeta se toman 1000 μ l de la muestra total y se colocan en un tubo de ensayo estéril con 9 ml de solución fisiológica de sembrado y homogeneizar con un agitador, obteniendo una dilución de 10^{-2} ; repetir dos veces para llegar a una dilución de 10^{-4} .

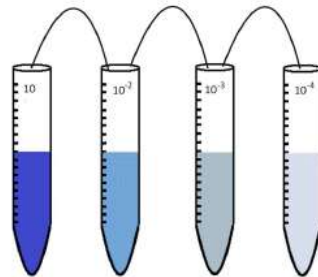


Figura 1. Proceso de inoculación de la muestra en tubos con medio de cultivo con agar
Fuente: (Moreno & Albarracín, 2012)

El siguiente esquema (Figura 2) explica el proceso de inoculación en placa con medio sólido. Con una pipeta micropipeta se extrae 100 μ l del inóculo y volcarlo en una placa con el medio seleccionado. Con la ayuda de una espátula de Drigalsky previamente esterilizada, esparcir el inóculo de manera homogénea en todas direcciones hasta que la superficie del agar quede completamente seca. Por último, incubar las placas en posición invertida durante 24 horas en una estufa a 28°C.

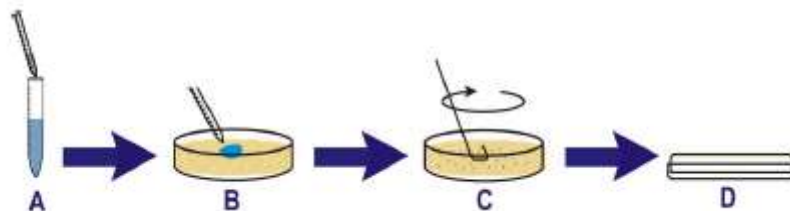


Figura 2. Proceso de inoculación de la muestra en placa con medio de cultivo con agar
Fuente: (Moreno & Albarracín, 2012)

Transcurridas 24 horas (en algunos casos hasta más tiempo), se observan colonias separadas en las placas (Figura 3), las cuales deben ser resembradas en una nueva placa

de Petri. La resiembra se realiza transfiriendo las colonias de interés con ayuda del asa de siembra, y en la nueva placa distribuir las células con la técnica de estriado en agar. Por último, incubar las placas en posición invertida durante 24 horas en una estufa a 28°C.

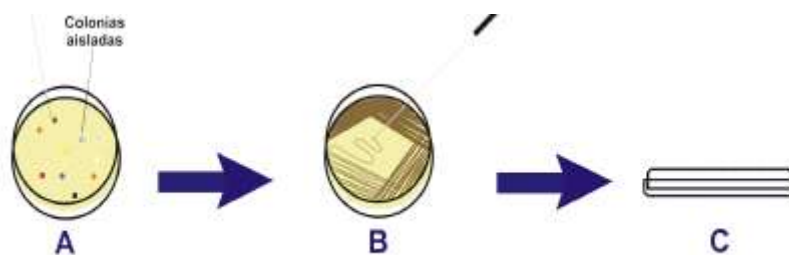


Figura 3. Resiembra de las colonias aisladas

Fuente: (Moreno & Albarracín, 2012)

El paso final del aislamiento consiste en lograr un almacenamiento permanente del microorganismo aislado, lo cual se consigue mediante la confección de un cepario.

Una alternativa comúnmente utilizada es mantener las células a temperaturas de entre 20°C y -80°C en un agente conservante como el glicerol al 20%, para lo cual debe cultivar el microorganismo en medio líquido hasta su fase exponencial de crecimiento, luego por centrifugación obtenemos un pellet de células y eliminamos el sobrenadante constituido por el medio de cultivo para posteriormente refrigerarlas.

También se puede optar por deshidratar las células mediante liofilización. Algunos microorganismos como algas y hongos son vulnerables a estas técnicas por lo cual se requieren resiembras periódicas para mantener la disponibilidad de los microorganismos.

2.3.2 METODOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE SALMONELLA

El aislamiento de la bacteria como lo mencionan Diana Pachón, Adriana Pulido, & Carlos Moreno (2011) se realiza de acuerdo con la norma ISO 6579:2002/Amd 1:2007, con adición de algunos medios de cultivo que han demostrado dar buenos resultados en la recuperación del microorganismo. Las muestras fueron procesadas para evaluar la presencia de *Salmonella sp.*, siguiendo cuatro pasos en el procedimiento:

PRE-ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO: A cada muestra se le adicionaron 250 ml de caldo lactosado estéril e inmediatamente se llevó a incubación a una temperatura de 37°C, durante un periodo de 18-24 horas.

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO: A partir del caldo de pre-enriquecimiento no selectivo, se obtiene con una jeringa estéril 10 ml de la suspensión y se lleva a un tubo de ensayo con 10 ml de caldo tetracionato que se incuba en baño serológico a $43\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES: La siembra se realiza mediante técnica de aislamiento o agotamiento de colonias; las cajas se incuban a una temperatura de 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las colonias compatibles con el género *Salmonella* sp. se detectan en agar MacConkey® por su característica macroscópica de ser lactosa negativo y en CHROMagar OrientaciónBD® por ser incoloras debido a que no se presenta reacción con los sustratos cromógenos del medio; adicionalmente, en los medios empleados las colonias presentan borde definido, tamaño aproximado de 1 a 1.5 mm de diámetro y ligeramente convexas.

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR: Las colonias compatibles de *Salmonella* sp. son aisladas en medios diferenciales como Agar Hektoen Entérico y CHROMagar Salmonella. Macroscópicamente en H.E las colonias se clasifican como sospechosas de *Salmonella* sp. por su característica lactosa negativo evidenciándose en ella una coloración verde – azulada. En CHROMagar Salmonella debido a diferencias metabólicas en la presencia de cromógenos del medio, las colonias de *Salmonella* sp. se observan de color rosa – púrpura, mientras que los microorganismos pertenecientes a otros géneros se observan con pigmento verde – azulado o son completamente inhibidos.

2.3.3 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL A PARTIR DE CAÑA DE AZÚCAR

Para la producción de microorganismos (levaduras) según García, et al., (2017) se inicia con la etapa de aislamiento y es de vital importancia para la obtención de cepas de interés en las fermentaciones alcohólicas. Seleccionar cepas adecuadas de levaduras autóctonas para cada tipo de proceso fermentativo podría llevar a mejorar la calidad del producto deseado.

Las levaduras han sido tradicionalmente aisladas a partir de sustratos de frutas, así como de otros alimentos naturales o procesados. Esto se debe a su asociación con sustratos azucarados y la consiguiente participación en diversos procesos de fermentación.

Se ha reportado una gran cantidad de aislamientos de levaduras a partir de diferentes materiales como jugos, melazas, variedades de plantas y fermentación de vinos. Los criterios utilizados para la selección de cepas consisten en una sucesión de pruebas para determinar la ausencia o presencia de determinados caracteres que se consideran importantes para el proceso de fermentación.

Se han realizado trabajos de aislamiento de levaduras utilizando maleza de caña de azúcar, y tomando como criterio de selección la producción de etanol, resultando ser capaces de tolerar concentraciones de etanol entre 5 y 10 % (v/v).

PROCESO DE AISLAMIENTO DE LEVADURAS

El proceso que ha propuesto García et al., (2017) para obtención de cepas de levadura productoras de bioetanol a partir de jugo de caña de azúcar se presenta en la Figura 4, el cual incluye una selección primaria y una selección secundaria. La obtención de nuevas cepas fermentadoras permitirá hacer una fermentación más eficiente y aprovechar de manera más global los recursos o sustancias que se encuentran en el jugo de la caña de azúcar o de cultivos bioenergéticos.

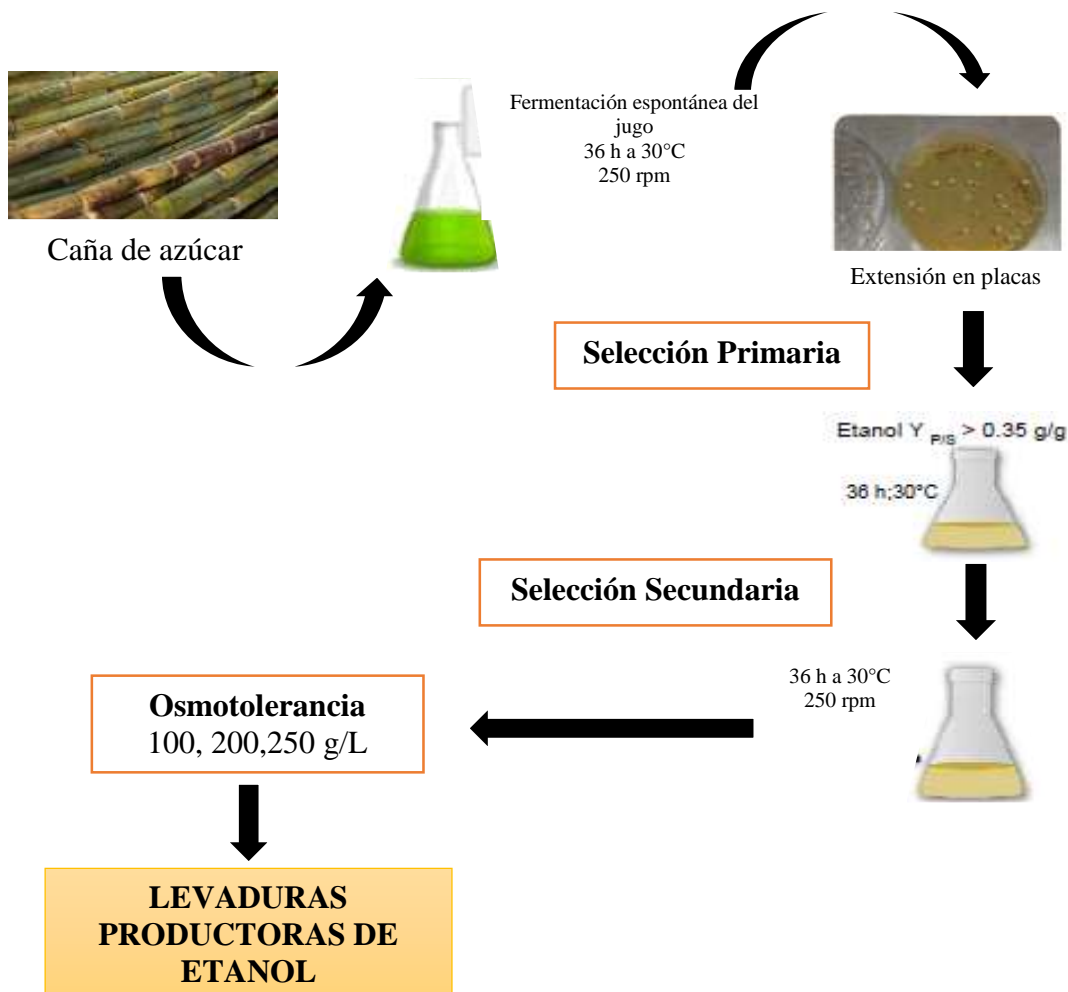


Figura 4. Esquema de obtención de etanol de levaduras productoras de etanol

Fuente: (García et al., 2017)

AISLAMIENTO DE LEVADURAS

El aislamiento se realiza a partir de pulpa y zumo de frutas, así como de otros alimentos naturales o procesados. Esto se debe a su asociación con sustratos azucarados y la consiguiente participación en diversos procesos de fermentación García, et al., (2017).

Para el aislamiento de levaduras utilizando jugo de caña y tomando como criterio de selección la producción de etanol, resultando ser capaces de tolerar concentraciones de etanol entre 5 y 10 % (v/v), el jugo fermenta de manera rápida a 30°C y 250 rpm durante 36h. Se toma 1mL de jugo fermentado y se prepara diluciones, las cuales son sembradas por medio de la técnica se siembra en placa por expansión, en un medio de cultivo que contiene 20 g/L glucosa, 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L agar-agar y 0.1 g/L de antibiótico. (García et al., 2017)

ACTIVACIÓN Y SELECCIÓN DE LEVADURAS

Se seleccionan los microorganismos que habitualmente son utilizadas en la industria por su capacidad fermentativa en la producción de etanol. Para la activación se toma el inóculo de las cepas almacenadas para el posterior crecimiento a una temperatura de 30°C. (García et al., 2017)

PROPAGACIÓN Y CRECIMIENTO

Los microorganismos que provienen del cultivo puro del laboratorio se propaga mediante pasos sucesivos estériles en condiciones aeróbicas, aumenta la biomasa en el prefermentador con un volumen que oscila entre 10 y 20% del fermentador (Suárez-machín et al., 2016). Las levaduras crecen simultáneamente con la producción del alcohol por espacio de unas 20 h. La producción de alcohol continúa entonces a una velocidad decreciente, concluyendo en ciclo de 24 a 30 h de fermentación para obtener una concentración final de 6 a 7 % de volumen. (Suárez-machín et al., 2016)

RECUPERACIÓN

A lo largo del proceso de fermentación, la levadura se desarrolla prodigiosamente, esto constituye un producto valioso, tanto al ser recuperada como para alimento animal, como para recircularla en el proceso y reiniciar la fermentación (Suárez-machín et al., 2016).

2.4 TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS

Las tecnologías que se utilizan para su producción se pueden clasificar de acuerdo con la materia prima que se utilice: ricos en azúcares simples (caña de azúcar, melaza) y los abundantes en almidón (papa, camote y cereales), usan una tecnología llamada de "primera generación" donde el costo de la materia prima representa de un 60 a 80 % del costo final del etanol. (García, et al., 2017)

MATERIA PRIMA

Las principales materias primas usadas en la fabricación de levadura es el cultivo puro de la melaza para producir la levadura fresca de *Saccharomyces*. La melaza de caña de azúcar es la principal fuente de carbono que promueve el crecimiento de la levadura. La melaza contiene entre 45 a 55% en peso de azúcares fermentables, en forma de sacarosa, glucosa y fructuosa.

FERMENTACIÓN

La levadura crece en una serie de fermentadores. Estos fermentadores son operados bajo condiciones anaeróbicas (limitación o ausencia de oxígeno) los azúcares fermentables son consumidos en la formación de etanol y dióxido de carbono.

SECADO

Una vez que se ha alcanzado el crecimiento óptimo de levadura, ésta es recuperada desde el fermentador final mediante separación centrífuga. Luego la levadura se lava en un filtro y rotatorio con agua helada para retirar la sal agregada antes de filtrar para obtener una mejor deshidratación. Posteriormente la levadura sólida es concentrada mediante filtros prensa o filtros rotatorios al vacío.

2.4.1 ESCALADO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LEVADURAS

Existen gran variedad de criterios que permiten definir los límites dentro de los cuales se puede aplicar el escalado de un proceso.

ESCALA DE LABORATORIO:

La producción de levaduras tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial, se realiza a partir de hidrato de carbono (melaza de azúcar). Como inicio de esta etapa es que las cepas de las levaduras se cultivan a nivel de laboratorio a una temperatura de 30°C con agitación orbital de 200 rpm para los medios líquidos YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*). (Ruiz, 2011)

ESCALA PILOTO:

El proceso de fermentación continua se inicia con la preparación y propagación de la levadura en el laboratorio. Posteriormente se inoculan los reactores aerobios (propagadores) en planta piloto, garantizando un tiempo de residencia en cada uno de ellos para alcanzar las poblaciones adecuadas al proceso. A medida que cada tanque propagador cumple su tiempo de residencia, el medio va pasando al siguiente propagador hasta llegar al tanque reproductor continuo de levadura. Este tanque tiene el objetivo de maximizar la población de levadura y sostener un valor adecuado de biomasa en el resto del proceso. (Ordóñez Ortega, Rivera Mariño, & Franco Mejía, 2013)

Después se inyecta la levadura a una serie de fermentadores anaerobios, junto con la alimentación requerida para obtener el etanol con una concentración del 9%. El etanol

pasa por un tanque sedimentador, en el cual son separados el etanol y la levadura. Esta última es enviada a un tanque activador que se encarga de recuperar la levadura y enviarla nuevamente a la serie de fermentadores, con el fin de incrementar la eficiencia del proceso. El etanol es almacenado en un tanque para ser enviado al proceso de destilación. (Ordóñez & Ortega et al., 2013)

ESCALA INDUSTRIAL:

La producción industrial de levaduras para la obtención de bebidas alcohólicas no difiere en gran medida de la producción de levaduras panaderas, al menos en las dos primeras etapas, el mantenimiento de los cultivos puros y su propagación, lo que explica que fueran estas empresas las primeras en comercializarlas a principios de los años 60. En estos primeros años el producto final tenía las mismas características que la levadura prensada de panadería, pero debido al uso estacional de las levaduras vínicas fue necesario desarrollar nuevas formas de conservación, como es el secado, dando lugar a un producto más estable. (Guerra, Izurieta, & Paez, 2009)

2.5 TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. ETAPA DE FERMENTACIÓN

La producción de levaduras *Saccharomyces*, en algunos países ha estado en correspondencia con la producción de alcohol, sin embargo, muchos de ellos no recuperan la levadura para fines alimenticio, a su vez la recirculan al proceso de producción de etanol (Nieto, 2009). Tanto la producción de levadura como la de etanol son reacciones exotérmicas, por lo que es necesario eliminar el calor desprendido en el transcurso de la fermentación y mantener la temperatura cerca del valor óptimo (33 a 34°C); de lo contrario la temperatura aumenta hasta 40 o 42°C con sensibles pérdidas en el rendimiento. (Suárez-machín et al., 2016)

El uso de levaduras como probióticos es ampliamente utilizado en la alimentación de los rumiantes y presentan buenas perspectivas en un futuro, constituyen una de las alternativas más válidas al uso de aditivos antibióticos tras su prohibición en el año 2006. Por otro lado, los esfuerzos que se han hecho para emplear las levaduras como suplemento seco de dietas de animales y humanos con la finalidad de combatir el hambre y aumentar la productividad no han dado los resultados esperados. (Carolina & Estrada, 2007)

2.5.1 SISTEMA CONTINUO

Según Suárez-machín et al., (2016) menciona que la fermentación continua aumenta la eficiencia química del proceso obteniéndose mayores cantidades de etanol, refiriendo que los métodos de fermentación continua se patentaron en la década de los 50 y desde entonces han hecho que la industria de las bebidas alcohólicas haya experimentado un crecimiento apreciable.

Cuando se utiliza la fermentación continua, se elimina el llenado y vaciado de los fermentadores y también la necesidad de controladores, equipos de enfriamiento, que son instalados solamente en los fermentadores donde hay necesidad de hacerlo, eliminando con esto la ociosidad y el costo de inversión, mientras que el riesgo de contaminación se incrementa por lo que se requiere mayor esterilidad en el proceso.

En la actualidad se han realizado estudios de cinética para la producción de etanol utilizando la levadura *Saccharomyces* donde se han registrado valores de 50,5 g /L a las 24 h, partiendo de 100 g/L con un rendimiento del 97,2% en condiciones de fermentación que han permitido conocer el tiempo en el que se consume del sustrato, así como la producción de etanol.

En el proceso de producción de levaduras, se debe tener un cuidado especial en el control estricto de la oxigenación, debido a la tendencia de este microorganismo a desviar su metabolismo hacia la producción de etanol en condiciones de anaerobiosis. Este comportamiento puede evitarse si se propaga en modo *fed batch* en el que los azúcares se suministra el medio a través de un programa que garantiza bajas concentraciones de sustrato todo el tiempo.

Brasil utiliza dentro de su tecnología el sangrado de las levaduras tanto al ser recuperada para su empleo como alimento animal (en crema o seca) o para recircularla al proceso y reiniciar la fermentación. La crema de levadura sangrada es sometida a un proceso llamado fermentación endógena donde por las condiciones estresantes, la levadura consume sus propias reservas de carbohidratos y como consecuencia de este fenómeno aumenta la composición de proteína celular, haciéndose necesaria antes de secar la levadura la desalcoholización de la crema que puede ser realizada por lavado. (Suárez-machín et al., 2016)

2.5.2 SISTEMA DISCONTINUO

Llamado también proceso en *batch*, es de gran importancia para su amplio uso. Las técnicas van a depender si el proceso es aerobio o anaerobio. Puede considerarse como un sistema cerrado. La solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la inoculación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se adiciona oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos, cambia generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células. (Fajardo & Sarmiento, 2007)

La productividad típica de un proceso discontinuo clásico en *batch* es de 1,8 a 2,5 g de etanol por litro de fermentador en una hora. Esta productividad puede aumentarse de manera sensible se recuerda la levadura producida en el fermentador o se emplea la fermentación continua. En estos casos los valores típicos se encuentran entre 5 y 8 g de etanol por litro de fermentador por hora. (Fajardo & Sarmiento, 2007)

La tecnología de recuperación sucede en la etapa después de la fermentación, las levaduras son separadas por centrifugación y lavadas. Se pasan por filtros prensas o rotatorios para disminuir el contenido de agua, hasta obtener un producto de 68 o 70% de humedad, conocido como levadura prensada, la cual se envasa en bloques o en forma granulada en sobres de nylon. Esta levadura se almacena bajo refrigeración (Suárez-machín et al., 2016), cuando el proceso de producción de alcohol se realiza de manera eficiente, es posible obtener alrededor de 30 kg de crema de levadura con 20% de concentración en volumen/hectolitro de alcohol que se produzca.

La levadura seca activa se utiliza en caso de no existir refrigeración o por requerirse períodos prolongados de almacenamiento. Consiste en secar la levadura en secadores de lecho fluidizado de atomización o al vacío. Se obtiene una levadura con 8% de humedad que conserva su actividad biológica. El producto se envasa en recipientes herméticos. (Suárez-machín et al., 2016)

2.6 VIGILANCIA TECNOLÓGICA

La vigilancia tecnológica y la inteligencia competitiva son procesos estrechamente unidos y orientados a la mejora de la competitividad de las empresas, así como al aumento de la eficacia de las administraciones públicas, todo ello dentro de un entorno innovador.

Aunque en otros países como Canadá o Francia son prácticas implantadas desde hace tiempo, en España han empezado a cobrar fuerza sólo en los últimos años y ya se pueden encontrar empresas y organismos gestores científicos que han incorporado paulatinamente este tipo de actividades a sus líneas de trabajo. (Elea, Toledo, & Román, 1999)

El objetivo de la vigilancia tecnológica es enfocar, captar, analizar y difundir información de diversa índole económica, tecnológica, política, con el fin de identificar oportunidades y amenazas provenientes del entorno, que puedan incidir en el futuro de una organización. (Arango Alzate & Tamayo Giraldo, 2012)

Como ventajas de la VT está en que ayuda a alertar sobre innovaciones científicas o técnicas susceptibles de crear oportunidades de desarrollar nuevos procesos, busca soluciones a los problemas sobre las organizaciones investigadoras, los sistemas de gestión de calidad se encuentran positivamente relacionadas con la innovación. (Elea et al., 1999)

Bajo la idea de responder a la necesidad de un instrumento basado en estándares internacionales alineados con las normas ISO 9001 y 14001, la Asociación Española de Normalización (AENOR) desarrolló la serie de normas UNE 166000 las cuales presentan los requisitos para reconocer, identificar y elaborar posibles proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i), así como buscan implantar un sistema de gestión, como la estructura de un sistema de Vigilancia Tecnológica e Investigación Competitiva que contempla los siguientes puntos:

- Responsabilidad de la dirección en el proceso de vigilancia tecnológica.
- Disponibilidad de recursos suficientes y adecuados.
- Establecimiento de un proceso de vigilancia tecnológica consiste en tres fases: identificación de las necesidades y fuentes de información, búsqueda, tratamiento y validación de la información y puesta en valor la misma.
- Acciones tomadas en relación con los resultados.

En la medida que el sistema de información es un pilar fundamental de las actividades de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva, el profesional de la información tiene un importante papel que desempeñar. Además, su participación puede verse ampliada con la realización de estudios bibliométricos y cientiométricos que permitan identificar áreas de investigación emergente. (Arango Alzate & Tamayo Giraldo, 2012)

La identificación de necesidades (Figura 5), fuentes y medios de acceso de información determina que información se necesita y cuales fuentes de información, recursos y tecnologías de información. Consiste en la búsqueda y análisis de la información, considerando su pertenencia, calidad y fiabilidad de obtener la información en el momento oportuno para poder difundirlo. Consta de validar la información según los requerimientos de la organización y los procesos de toma de decisiones (Arango Alzate & Tamayo Giraldo, 2012).

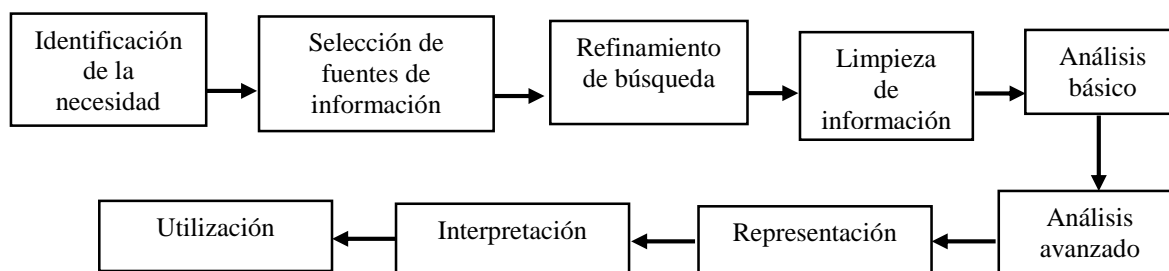


Figura 5. Esquema de la secuencia y estructura de la vigilancia tecnológica

Fuente: (Arango & Tamayo, 2012)

2.6.1 BIBLIOMETRÍA Y CIENCIOMETRÍA

CIENCIOMETRÍA: “ESTUDIO DE LOS ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LA CIENCIA COMO DISCIPLINA”

La cienciometría no es más que la aplicación de técnicas bibliométricas al estudio de la actividad científica. Su alcance va más allá de las técnicas bibliométricas por que puede emplearse para examinar el desarrollo y las políticas científicas. Los análisis cuantitativos de la cienciometría consideran a la ciencia como una disciplina o actividad económica, por lo que pueden establecerse comparaciones entre las políticas de investigación, sus aspectos económicos y sociales, y la producción científica (Wiesner et al., 2010).

Para percibir los matices que distinguen la estrecha relación bibliometría-cienciometría en el estudio de la actividad científica (Figura 6), (Spinak, 1998) plantea que la bibliometría estudia la organización de los sectores científicos y tecnológicos a partir de las fuentes bibliográficas para identificar a los autores, sus relaciones, y sus tendencias; mientras que la cienciometría se encarga de la evaluación de la producción científica mediante indicadores numéricos de esas fuentes bibliográficas. La bibliometría trata con las varias mediciones de la literatura, de los documentos y otros medios de comunicación, mientras que la cienciometría se relaciona con la productividad y utilidad científica (Spinak, 1998).

La cienciometría usa técnicas de análisis estadístico para investigar las características de la investigación científica. Puede considerarse como un instrumento de sociología de la ciencia (Spinak, 1998).

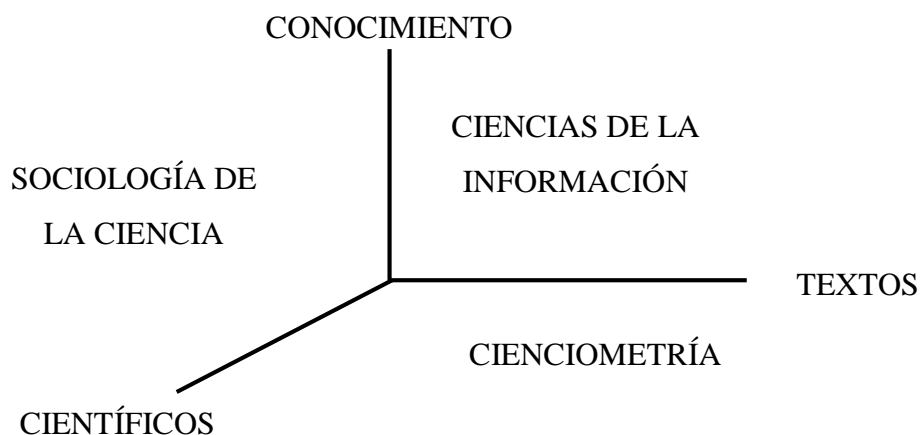


Figura 6. Esquema de la cienciometría

Fuete: (Spinak, 1998)

La bibliometría estudia la organización de los sectores científicos y tecnológicos a partir de las fuentes bibliográficas y patentes para identificar a los actores, a sus relaciones y a sus tendencias. Por lo contrario, la cienciometría se encarga de la evaluación de la producción científica mediante indicadores numéricos de publicaciones, patentes, etc. La bibliometría trata con las varias mediciones de la literatura, de los documentos y otros medios de comunicación, mientras que la cienciometría tiene que ver con la productividad y utilidad científica. (Spinak, 1998)

La importancia de las técnicas bibliométricas y cienciometrías pueden notarse al analizar la lista siguiente de posibilidades de aplicación, lista que no pretende ser completa.

- Identificar las tendencias y el crecimiento del conocimiento en las distintas disciplinas.
- Estimar la cobertura de las revistas secundarias.
- Medir la utilidad de los servicios de diseminación selectiva de información.
- Predecir las tendencias de publicación.
- Estudiar la dispersión y la obsolescencia de la literatura científica.
- Adaptar políticas de descarte de publicaciones.

Estas técnicas de recuento que caracterizan lo que hoy se conoce como bibliometría, tiene múltiples utilidades que van desde el análisis del volumen de publicaciones, las fuentes más citadas, la productividad de los autores e instituciones, revistas o materias, y las

revistas más utilizadas por los investigadores, hasta el conocimiento amplio de la estructura, procesos, evolución y demás aspectos relacionados con la naturaleza de las Ciencias.

2.6.2 INDICADORES BIBLIOMÉTRICOS

Los indicadores bibliométricos tienen como definición que son datos estadísticos deducidos de las publicaciones científicas. Su uso se apoya en el importante papel que desempeña las publicaciones en la difusión de los nuevos conocimientos, papel asumido a todos los niveles del proceso científico. (Velasco, Eiros Bouza, Pinilla, & San Román, 2012)

Los indicadores bibliométricos proporcionan información sobre los resultados del proceso investigador, su volumen, evolución, visibilidad y estructura y se pueden clasificar en indicadores de actividad (cuantitativos) y de impacto (cualitativo), el empleo de los indicadores presenta una serie de ventajas frente a otros métodos utilizados en la evolución científica, al tratarse de un método objetivo y verificable, cuyos resultados son reproducibles. Además, estos indicadores se pueden utilizar un gran volumen de datos. (Velasco et al., 2012)

Detrás de los indicadores bibliométricos y cienciométricos subyace una teoría tradicional de la ciencia que la identifica con el conocimiento que ella produce, asume esta producción como tarea esencial de la ciencia, y atribuye a las revistas de corriente principal y sus atributos a las revistas de corriente principal y sus atributos la capacidad de juzgar el valor de estas novedades (Wiesner et al., 2010).

Así mismo, los indicadores bibliométricos presentan una serie de limitaciones en su utilización. Para empezar, solo se pueden utilizar en aquellos contextos en que los resultados de la investigación dan lugar a publicaciones científicas. Por este motivo, su validez es máxima relevancia en el estudio de las áreas básicas y menos en los tecnológicas o aplicadas. (Velasco et al., 2012)

Los indicadores de actividad permiten conocer el estado real de la ciencia. Entre ellos se encuentran:

- De producción: recuento del número de publicaciones científicas de un autor, grupo de investigación o institución. Estos indicadores sólo aportan información sobre la cantidad de las publicaciones, pero no sobre su calidad.
- De circulación: miden el número total de publicaciones en bibliotecas y bases de datos.

- De dispersión: análisis de las publicaciones sobre un tema o área entre las diversas fuentes de información. Permite conocer si los trabajos de un área específica se concentran en pocas o muchas revistas.
- De uso de la literatura científica: Miden el número de las publicaciones y el número de referencias que se incluyen en las publicaciones. Cada editorial tiene sus propias normas de publicación y el número de referencias bibliográficas que se pueden incluir en un artículo difiere de una revista a otra.
- De colaboración: Estos son los que evalúan la colaboración entre autores e instituciones. El indicador más utilizado para valorar la colaboración entre autores es el índice de coautoría que es un promedio del número de autores que firman los documentos y que permiten determinar el tamaño de los grupos de investigación. Otro indicador es la tasa de documentos coautorados que es la proporción de documentos firmados por más de un autor.

El desarrollo de este estudio se cumplió mediante la identificación de las fuentes de información seleccionadas (artículos científicos, revistas) y la revisión de los contenidos correspondientes. Se realizó la exploración de las secciones y características de los trabajos publicados, con el fin de unificar criterios de clasificación entre todos los artículos, entre ellos el tipo de material publicado y las denominaciones empleadas para este. (Ávila-Toscano, Marenco-Escuderos, & Orozco, 2014)

Spinak, (1998) menciona que para definir precisamente las ideas y los términos de la bibliometría se dice que comprende la:

- Aplicación de análisis estadísticos para estudiar las características del uso y creación de documentos.
- Estudio cuantitativo de la producción de documentos como se refleja en las bibliografías.
- Aplicación de métodos matemáticos y estadísticos al estudio del uso que se hace de libros y otros soportes dentro y entre los sistemas de bibliotecas.
- Estudio cuantitativo de las unidades físicas públicas, o de las unidades bibliográficas, o de sus sustantivos.

Habiendo definido la bibliometría, se puede definir la cienciometría, esta aplica técnicas bibliométricas a la ciencia. El término ciencia se refiere a las ciencias físicas y naturales, así como a las ciencias sociales. Pero la cienciometría va más allá de las técnicas bibliométricas pues también examina el desarrollo y las políticas científicas. Los temas

que interesan a la cienciometría incluyen el crecimiento cuantitativo de la ciencia, el desarrollo de las disciplinas y subdisciplinas, la relación entre ciencia y tecnología, la obsolescencia de los paradigmas científicos, la estructura de comunicación entre los científicos .(Spinak, 1998)

CAPITULO III

3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.2 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se desarrolló en la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en el Km 2 ^{1/2} vía al Tena (Paso lateral), Cantón Puyo, Provincia de Pastaza, se ubica en el centro de la región amazónica ecuatoriana.

La investigación se llevó a cabo en un tiempo de 400 h, en las que se consideró la obtención de información teórica.

3.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Durante la investigación se utilizó información recopilada a nivel mundial, de Ecuador y de la provincia de Pastaza, sobre la agroindustria de la caña de azúcar y el proceso de fermentación del etanol y la producción de levaduras en esta etapa. El carácter de estudio será de forma cualitativa ya que se va a proponer una metodología sobre como producir levaduras como inóculo mediante la recopilación de información.

El tipo de investigación que se realizó es a nivel explorativa, ya que se se basa en recopilación bibliográfica que describe el proceso de producción de etanol y de levaduras.

3.4 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

Para la realización del presente estudio se consideró la fase: explorativa. Tomando en cuenta que la investigación a realizarse no cuenta con antecedentes de obtener investigaciones realizadas en la provincia de Pastaza, por lo tanto, es de gran importancia para los propietarios y emprendedores de etanol en las diferentes destilerías ubicadas en la Amazonía.

Para el cumplimiento del presente proyecto se ha propuesto objetivos específicos que se describen a partir de la Figura 7, partiendo de:

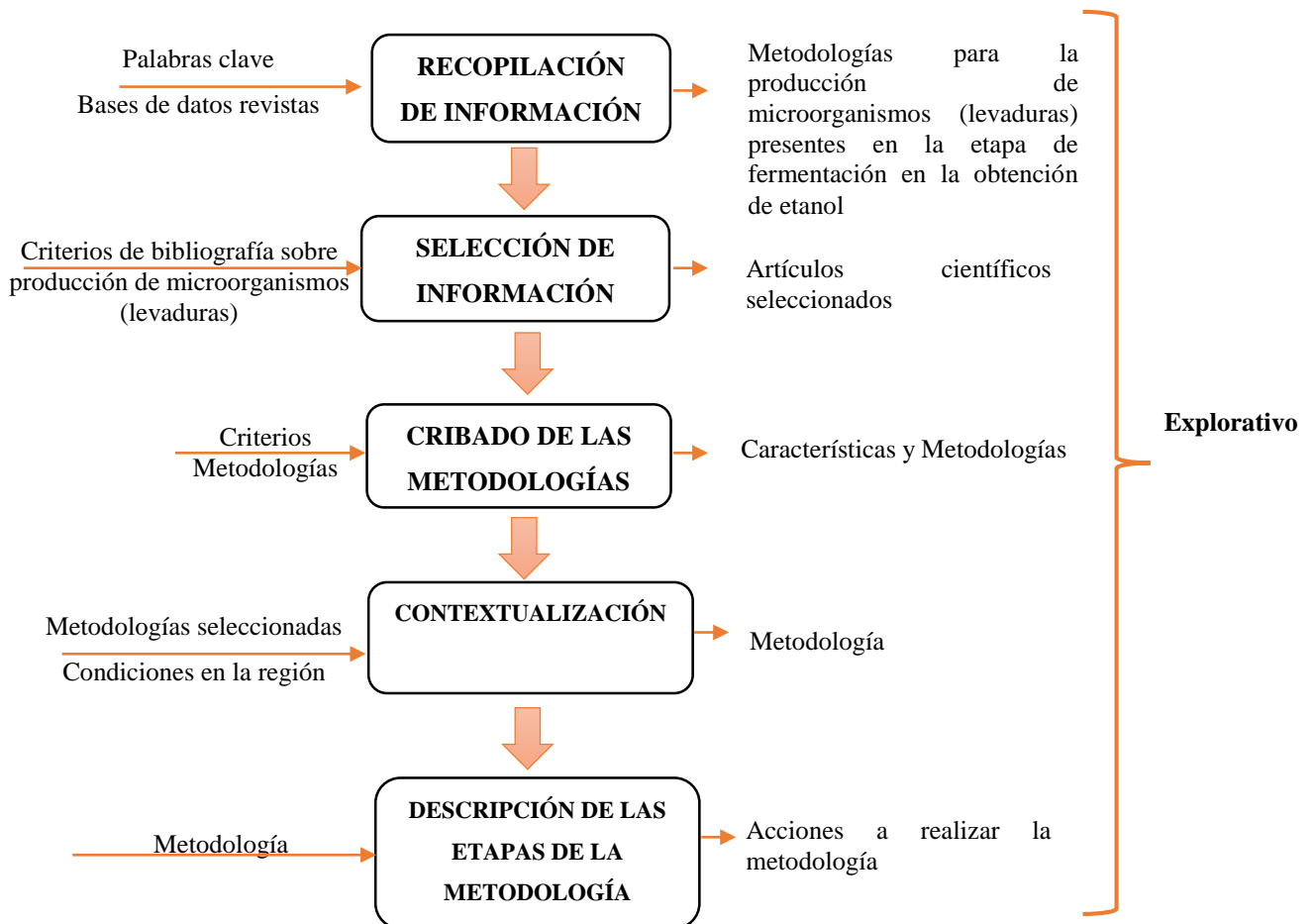


Figura 7. Diagrama heurístico de la metodología de investigación

Fuente: Elaboración propia

3.4.1 RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

La información sobre metodologías para la producción de microorganismos (levaduras) que se encuentran presentes en la etapa de fermentación del etanol se obtuvo a través de fuentes bibliográficas: Artículos científicos, tesis, manuales, libros, documentos, páginas web.

Se realizó la búsqueda por medio de palabras claves como: fermentación, levaduras, microorganismos, metodologías, agroindustria de caña de azúcar, etc. Esta información se obtendrá de bases de datos de revistas como: *Scielo*, PubMed, Dialnet.

3.4.2 SELECCIÓN DE INFORMACIÓN

En la selección de información se tomó en cuenta los criterios de la bibliografía obtenida sobre la producción de microorganismos (levaduras), la información se obtuvo de fuentes confiables en inglés y español. Después de seleccionar y analizar las fuentes, se

seleccionó la información que sea de interés y que contenga criterios de confiabilidad para el presente proyecto.

Los criterios a tomarse en cuenta son los seguimientos de las bases de datos que son: año de la revista, título de la revista, volumen de la revista, ISSUE, páginas, indexación, impact factor, número de citas, estos indicadores son un referente importante para la investigación y muestra confiabilidad de información que esta representa. Son una fuente importante para la construcción de información bibliométrica y esto determina la producción científica en un tema determinado.

3.4.3 CRIBADO DE LAS METODOLOGÍAS

Mediante el cribado de las metodologías se realizó un proceso de selección rigurosa y de análisis del contenido y de la información antes obtenida. Es una función importante y principal para llegar a la obtención de la metodología que contenga las características e información necesaria en relación a la producción de microorganismos (levaduras).

Esto nos permitió dar avance y desarrollo al proyecto de investigación, ya que comprendió el mecanismo adecuado para identificar y evaluar aquellos aspectos necesarios que podrían ser de interés que cada metodología contiene para la producción de microorganismos.

3.4.4 CONTEXTUALIZACIÓN

En esta etapa de contextualizar se realizó una interpretación de la información que se obtuvo sobre el número de destilerías que existen actualmente en la provincia de Pastaza y la producción de etanol de las mismas para analizar sobre la producción de los microorganismos que se da en la etapa de fermentación del jugo de caña de azúcar, los mismos que fueron utilizados para generar un inóculo para la obtención de etanol en mejores condiciones, ya que existe un gran desconocimiento por parte de los propietarios para realizar este proceso, a esta información se realizó un análisis detallado para comprender todos los antecedentes del ámbito regional y así llegar a desarrollarse el proyecto, de este modo llegar a profundizar el tema para la realización del mismo.

Por lo tanto, llegamos a finalizar la etapa de obtener la metodología de manera simplificada comprendiendo el contexto que esta conlleva y así pasar a la etapa de descripción.

3.4.5 DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA METODOLÓGICA

En esta etapa se detalla cada una de las acciones a desarrollarse en la metodología seleccionada para la investigación de este proyecto, se definieron los pasos ya investigados y se tomó en cuenta todos los aspectos ya identificados que se generan en la metodología para producir microorganismos.

La metodología empezó describiendo como fue abordada su investigación, sus fundamentos y los pasos que se llevaron a cabo. Los cuáles fueron:

1. Abordar la investigación con sus fundamentos de las principales metodologías utilizadas para la producción de diferentes tipos de microorganismos.
2. Determinar y definir la metodología para finalizar con el proyecto investigativo.
3. Definir las necesidades y resultados que se obtendrán de cada uno de los pasos que se definan.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron varios artículos científicos acerca de metodologías de producción de diferentes tipos microorganismos, entre ellos bacterias, levaduras y hongos, de los 11 artículos encontrados se procedió a realizar un cribado de los mismos en donde se tomó en cuenta los criterios cuantitativos y bibliométricos para cada uno, de los cuales 4 artículos fueron descartados ya que están relacionados con el aislamiento y producción de bacterias *Salmonella* y hongos que se encuentran en el medio ambiente. Los 7 artículos restantes están relacionados con levaduras, 4 de estos artículos sus autores Ricardo Moreno Virginia Helena Albarracín, (2012) & Diana Pachón et al., (2011) proponen que su aislamiento sea a partir de rechazos de cáscaras de frutas y otros que el procedimiento de cultivo se de en condiciones al ambiente.

Como resultado final se puntualizó que el artículo de la revista ICIDCA acerca de levaduras *Saccharomyces* y producción de etanol es el que se tomó en cuenta su propuesta metodológica, este artículo contiene información relevante acerca de cómo producir levaduras a partir de la caña de azúcar en el proceso de elaboración de etanol.

4.1 RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

La recopilación de información acerca de metodologías de producción de microorganismos se obtuvo mediante la ayuda de búsqueda de información en donde se utilizaron palabras clave como: metodologías, levaduras, inóculos, fermentación, aislamiento, en diferentes bases de datos, revistas con fuentes de información científica confiables, los artículos científicos que se obtuvieron para la selección de la etapa metodológica del proyecto se muestran en la Tabla 1. se encuentra en la página que está a continuación.

De todo lo anterior mencionado, se deriva una relación estrecha entre las tres metodologías de producción de microorganismos, lo cual involucra diferencias como concordancias. Como resultados para la selección de la metodología de producción de microorganismos (levaduras) se realizó un diagrama heurístico (Fig. 6), en donde se realizó un estudio explorativo y se describen cada una de las etapas a tomarse en cuenta para la selección de la metodología.

Tabla 1 Resultados de la búsqueda cuantitativa y parámetros bibliométricos

Fuente: Elaboración propia

Año	Nombre del artículo	Nombre de la Revista	Vol.	Núm.	Pág.	Indexación	Factor de impacto	N° Cita Google Acad.	Temática
2016	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y la producción de alcohol	ICIDCA	50	1	20-28	Latindex, Cuba Ciencias, Paper Science	NA	7	Industria de la caña de azúcar, Ingeniería Química
2009	Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de caña de azúcar	Dyna		159	153-161	Scielo, Redalyc, Scopus, Dialnet	NA	16	
2015	Evaluación de la producción de etanol a partir de melaza con cepas nativas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial	13	2	40-48	Scielo, Latindex, Dialnet, Google Scholar,	NA	1	
2009	Comparación de condiciones de cultivo para el aislamiento y recuento simultaneo de levaduras de suelos de bosques nativos de <i>Nothofagus</i> sp	Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica	44	1	3-abr	Scielo, Scopus	0.302	5	Ecología, Evolución, Comportamiento y Sistemática
2015	Aislamiento, selección e identificación de levaduras <i>Saccharomyces</i> sp.	AGROCIENCIA	49	7		Scielo, Scopus	0.27	2	Agronomía y Ciencia de cultivos, Ciencias Ambientales
2012	Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales	REDUCA	5	5	79-93		NA	5	
2012	Aislamiento, siembra y conservación de microorganismos	REDUCA	5	5	63-70		NA	3	
2011	Aislamiento y serotipificación de <i>Salmonella</i> sp. en estanques con <i>Crocodylus intermedius</i> y <i>testudines</i> cautivos	MVZ. Córdoba	16	2		Scopus, Elsevier, Latindex, Dialnet, Google Scholar	0.162	4	Ciencia y Zoología animal, Ciencia Veterinaria
2005	Metodología para el aislamiento y caracterización de levaduras provenientes del ecosistema ruminal	Revista Cubana de Ciencia Agrícola	39	1	47-52	Dialnet, CubaCiencias	NA	2	
2014	Aislamiento y caracterización de una levadura floculante para producir etanol del banano de rechazo	Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial	12	2	151-159	Scielo, Latindex, Dialnet, Google Scholar	NA	1	

2017	Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar	Ciencia UAT	11	2	80-92	NA	1
2005	Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz	Scientia et Technica	11	28		NA	27

4.2 SELECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

De los artículos obtenidos con respecto a metodologías, se realizó un análisis en donde se pudo verificar que durante los últimos años se obtuvieron cinco artículos del año 2013 al 2018 (41,7%), del mismo modo cinco artículos del año 2008 al 2012 (41,7%) y finalmente se evidenció dos artículos antes del año 2008 (16.6%), esto representa un total de 100%. Los resultados obtenidos de la búsqueda de información cuantitativa y criterios bibliométricos (Tabla 1) muestran una búsqueda preliminar de artículos científicos que se realizó en idioma español, en donde la mayor parte de los artículos mencionados están indexados a revistas como: Scopus, Scielo, Dialnet, Redalyc, Google Scholar y Latindex. Los artículos publicados en las revistas científicas antes mencionadas recibieron un proceso de evaluación en el número que han sido citados, esto permitió llegar a obtener un factor de impacto de las revistas y evaluar la importancia relativa de cada una y sobre los artículos publicados. Una vez que se ha evaluado y analizado se consideró que el artículo, Levadura *S. cerevisiae* y la producción de alcohol de la revista ICIDCA y está acorde con el tema de producción de microorganismos

4.3 CRIBADO DE LAS METODOLOGÍA

Varios autores como Moreno & Albarracín, (2012), (Diana Pachón et al., 2011) ; (García et al.,2017) & (Suárez-machín et al., 2016), proponen metodologías sobre la producción de diferentes tipos de microorganismos entre ellas están las levaduras, las cuales han sido analizadas y se ha tomado en cuenta que tienen una similitud en el proceso de obtención, estas metodologías utilizan cultivos para la obtención de inóculos a mayor escala, tienen una etapa de recuperación de microorganismos y trabajan con microorganismos de poblaciones extensas.

Se tomó en cuenta de cada una de las metodologías sus características apropiadas y acordes con el proceso de producción tanto de levaduras como de etanol, ya que son dos reacciones que se dan por igual. La metodología propuesta por los autores Suárez-machín et al., (2016) & (García et al., 2017) es una metodología que está enmarcada en el proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar y la obtención de levaduras en el proceso de fermentación del jugo.

Cada una de las etapas del proceso como: aislamiento, activación, selección, propagación, crecimiento y recuperación se describen.

4.4 DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA METODOLÓGICA

En la figura 8 se muestra el diagrama heurístico propuesto a partir de la metodología seleccionada y contextualizada a las condiciones de la Amazonia ecuatoriana.

Esta propuesta tecnológica cuenta con tres momentos. El primero se desarrolla a escala de laboratorio. En el segundo momento se desarrolla a escala de planta piloto. Este momento está definido por una toma de decisión si se satisface la demanda del inóculo por las destilerías de la región. En el caso de que no la decisión sea negativa entonces se pasa al momento de la metodología donde se produce las levaduras a escala industrial. Este último momento se caracteriza por el tipo de operación que puede ser discontinuo o continuo.

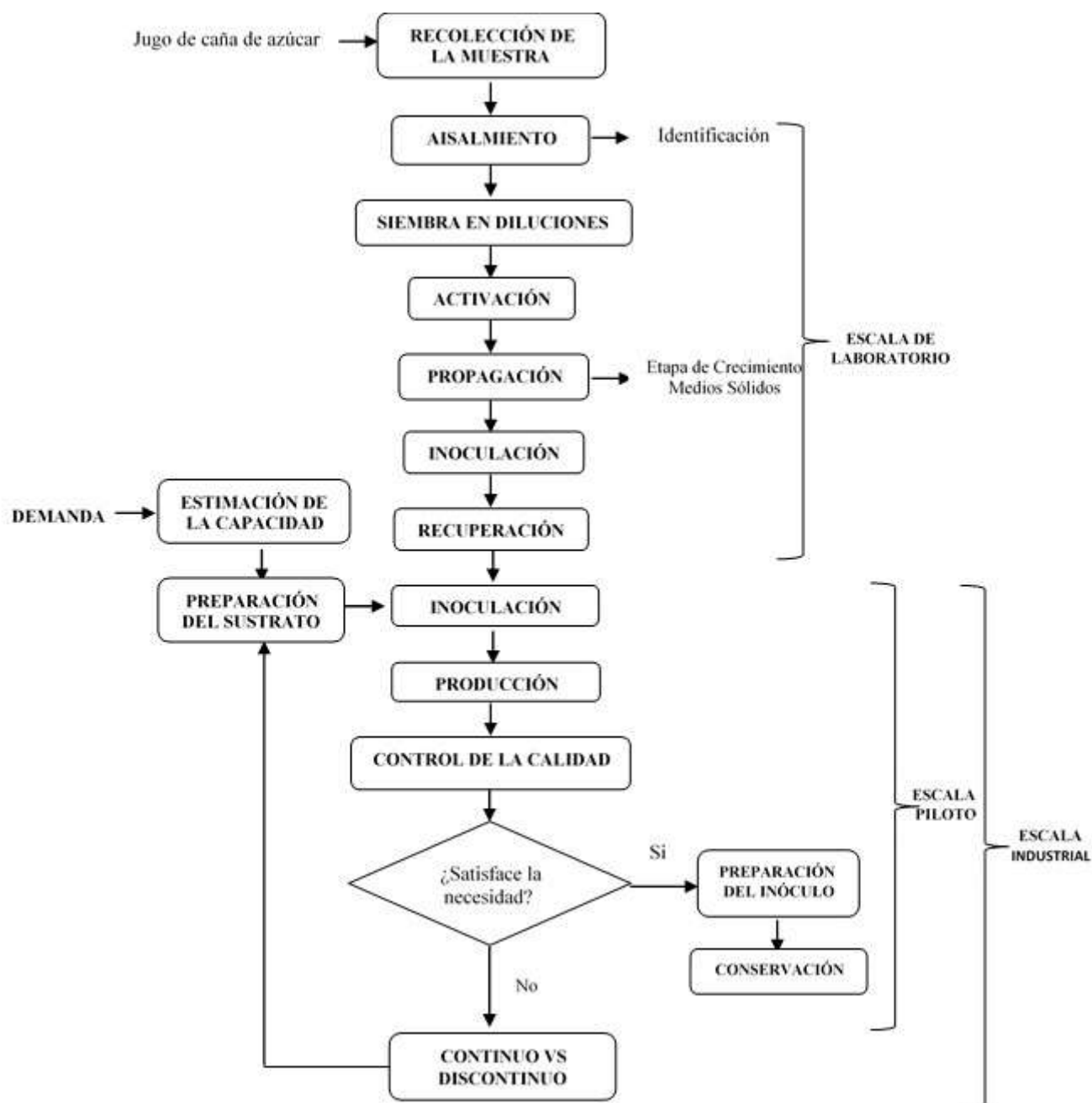


Figura 8. Diagrama heurístico propuesto para la producción de levaduras en el contexto de la Amazonia Ecuatoriana.

Fuente: Elaboración propia

La descripción de cada uno de los pasos se describe a continuación:

- **RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:** La recolección de las muestras se realiza a partir de la extracción del jugo de caña de azúcar, en frascos o recipientes estériles las cuales son trasladadas al laboratorio para realizar el respectivo procedimiento.

- **AISLAMIENTO DE LEVADURAS:** Para el aislamiento de levaduras utilizando jugo de caña y tomando como criterio de selección la producción de etanol, resultando ser capaces de tolerar concentraciones de etanol entre 5 y 10 % (v/v), el jugo fermenta de manera rápida a 30°C y 250 rpm durante 36h. Se toma 1 mL de jugo fermentado y se prepara diluciones, las cuales son sembradas por medio de la técnica de siembra en placa por expansión, en un medio de cultivo que contiene 20 g/L glucosa, 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L agar-agar y 0.1 g/L de antibiótico.

Es de vital importancia para la obtención de cepas de interés en las fermentaciones alcohólicas. Seleccionar cepas adecuadas de levaduras autóctonas para cada tipo de proceso fermentativo podría llevar a mejorar la calidad del producto deseado.

- **SIEMBRA EN DILUCIONES:** La técnica de dilución consiste en inocular 10 tubos de ensayo que contienen 9 mL de agua destilada. Se obtiene 1 mL de la muestra usando una micropipeta estéril, se inocula el primer tubo de ensayo, sin retirar la punta y se agita el mismo, después se invierte y se retira 1 mL que se inocula al segundo tubo y así continúa sucesivamente hasta llegar al tubo 10. Cada uno de los tubos con las distintas diluciones se agita y se toma 1 mL de esta solución que se invierte en cajas Petri que contienen un medio PDA sólido ya previamente preparado.
- **ACTIVACIÓN Y SELECCIÓN DE LEVADURAS:** Las cepas aisladas y debidamente identificadas son almacenadas en un banco de levaduras con un crioprotector. Se almacenan las cepas de diferentes géneros y especies, de las cuales se seleccionan las que habitualmente son utilizadas en la industria por su capacidad fermentativa en la producción de alcohol. Para la activación se toma el inóculo de las cepas almacenadas en el banco para el posterior crecimiento a una temperatura de 30°C.
Se seleccionan los microorganismos que habitualmente son utilizados en la industria por su capacidad fermentativa en la producción de etanol.
- **PROPAGACIÓN Y CRECIMIENTO:** Los microorganismos que provienen del cultivo puro del laboratorio se propagan mediante pasos sucesivos estériles en condiciones aeróbicas, aumenta la biomasa en el pre-fermentador con un volumen que oscila entre 10 y 20% del fermentador, estas levaduras crecen simultáneamente con la producción del alcohol por espacio de unas 20 h para que

- su producción de alcohol continúe a una velocidad decreciente, concluyendo en ciclo de 24 a 30 h de fermentación.
- INOCULACIÓN: Al realizar el asilamiento correctamente de las colonias se procede a preparar medios sólidos en tubos de ensayo de aproximadamente 25 mL, estos tubos se colocan de manera inclinada para conseguir un buen sembrado. Los tubos son inoculados con la muestra y con la ayuda del asa en forma de estrías son incubados por siete días a una temperatura promedio de $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ y luego almacenados en refrigeración a 4°C .
 - RECUPERACIÓN: Las levaduras son recuperadas de los tanques de fermentación y estas pueden ser reutilizadas de inmediato en nuevos procesos fermentativos sin necesidad de realizar algún tratamiento, siempre y cuando las condiciones sean correctas y asépticas.
Este proceso puede ser realizado varias veces teniendo en cuenta cada recuperación, ya que se obtienen generaciones distintas y con ello se obtiene inconvenientes al momento de elaborar la bebida alcohólica. Esto se debe a la presencia de microorganismos existentes que nos no viables y puede afectar en el proceso y que no actúen de una manera homogénea y llegue a afectar el producto final.
 - ESCALA PILOTO: Se inoculan en los reactores aerobios (propagadores) en planta piloto, garantizando un tiempo de residencia en cada uno de ellos para alcanzar las poblaciones adecuadas al proceso. A medida que cada tanque propagador cumple su tiempo de residencia, el medio va pasando al siguiente propagador hasta llegar al tanque reproductor continuo de levadura. Este tanque tiene el objetivo de maximizar la población de levadura y sostener un valor adecuado de biomasa en el resto del proceso.
 - ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD: Se estimó el número de destilerías actualmente existentes en la provincia de Pastaza que se dedican a la producción de etanol, de las cuales se analizó la producción de los microorganismos que se dan en la etapa de fermentación del jugo de caña de azúcar.
 - PREPARACIÓN DEL SUSTRATO: Para determinar un buen proceso de preparación del sustrato, se esteriliza, siendo esta la vía térmica usualmente utilizada, con esto se alcanza las condiciones de operación del sustrato para su posterior inoculación y se necesita de varias requerimientos nutricionales para su crecimiento:

- Carbono: Estos compuestos carbonatados son utilizados como una fuente de energía para las levaduras que necesitan azúcares como: hexosas, glucosa, fructosa, etc.
- Nitrógeno: ayudan a promover el crecimiento de las levaduras en el cultivo.
- Azufre: Constituye el 0.4% del peso seco de las levaduras y permite un crecimiento más rápido.
- INOCULACIÓN: Se adiciona al tanque fermentador una cantidad de levadura, esta se encarga de inocular y así abastecer a otros tanques existentes de microorganismos suficientes para el desarrollo del proceso a una temperatura no mayor de 25°C. Una de las formas de inocular al tanque fermentador es midiendo la concentración de las levaduras y se mantiene el jugo fermentado a una temperatura determinada. Se debe tener en cuenta que hay que controlar y mantener estable la concentración de levaduras en el tanque fermentador y que la levadura esté en condiciones adecuadas para la fermentación.
- PRODUCCIÓN: La producción de las levaduras arranca una vez esté llenado el tanque fermentador, llamado tanque madre, cuando haya alcanzado las condiciones ideales de crecimiento, se suministra la masa de la levadura y alrededor de 18 horas se tiene un cultivo es en fase exponencial ya que hasta que no se llegue a las 48 horas no se tiene un crecimiento en fase estacionaria.
- CONTROL DE CALIDAD: Para el conteo del número total de las levaduras presentes en las muestras se utiliza el método de recuento en Cámara de Neubauer. La viabilidad de las células es primordial para su utilización en otros procesos fermentativos, por ello se debe estimar su valor. Este método permite realizar recuentos y nos da un número aproximado de UFC/ml.
- ¿Se satisface la demanda?: En este paso se verifica que se satisfaga la demanda del inóculo por las destilerías identificadas. En caso de que satisfaga la demanda se pasa al paso de preparación del inóculo. En el caso de que no se satisfaga se pasa al siguiente paso de la tercera etapa de la metodología (escala industrial.)
- PREPARACION DEL INÓCULO: El punto de partida de cualquier fermentación es un recipiente limpio que ha sido esterilizado y llenado con el medio de cultivo estéril. Posteriormente, el fermentador se inocular con el microorganismo adecuado. El tamaño del inóculo generalmente es del orden del 1-10% del volumen total del medio. Si es inferior a esta proporción puede existir un excesivamente prolongado período de latencia, lo que prolonga el período de

fermentación. Para evitar estos problemas, el proceso de fermentación se lleva a cabo en cuatro etapas:

1. **Preservación del inóculo:** La preservación de las cepas de producción a lo largo de un período de tiempo largo es un requisito básico para una fermentación práctica. Los microorganismos pueden ser mantenidos viables fácilmente a través de un período de transferencia, pero lo que debe ser preservado es su capacidad de formar el producto de interés.
2. **Crecimiento del inóculo:** El cultivo preservado se reaviva inicialmente mediante crecimiento en un cultivo líquido en agitación o en medio líquido si se requiere la formación de esporas. Las condiciones utilizadas en el cultivo inicial (composición del medio, temperatura de incubación, etc.) dependerán del proceso específico.
3. **Fermentación de producción:** Dependiendo de la fermentación se utiliza biorreactores de distinto tamaño y no puede darse un esquema general para la inoculación de un fermentador de producción.
4. **A fin de obtener suficiente inóculo para el fermentador de producción,** deben realizarse precultivos en fermentadores más pequeños. Si un fermentador de producción se inicia con demasiado poco inóculo, el crecimiento se retrasa y la velocidad de formación del producto puede ser insatisfactoria. La concentración óptima del inóculo para el fermentador de producción determina el número de etapas del precultivo de fermentación que son necesarias.
 - **CONSERVACIÓN:** Como objetivo de conservar las levaduras es mantener sus características, morfológicas, fisiológicas y genéticas en las mejores condiciones posibles. Hay que mantener activada la levadura en frascos de agua estéril.
 - **ESCALA INDUSTRIAL:**
 1. **Propagación de cultivos,** lo que se realiza en el laboratorio y que comienza generalmente en un tubo de ensayo que contiene un repique reciente del microorganismo o un tubo liofilizado o congelado donde se conserva la cepa de interés o de una colonia del microorganismo previamente seleccionada. Este material microbiológico seleccionado constituye el punto de partida con el cual se debe aumentar la cantidad del mismo mediante sucesivos pasajes en frascos de volúmenes crecientes que son generalmente operados en agitadores de vaivén o rotatorios en cámaras de cultivo.

2. Fermentación: con el material obtenido anteriormente, se siembra el tanque de inóculo que puede tener un volumen de 50, 500 ó 1000 l según la escala industrial posterior. Del tanque de inóculo se pasa posteriormente al fermentador industrial cuyo volumen, que varía de acuerdo al producto a obtener y a su concentración, está comprendido comúnmente entre 10,000 y 100,000 l. En algunos casos especiales, como en la producción de proteína unicelular, los tanques de fermentación pueden llegar hasta 1,000,000 l. Un proceso esencial ligado a la producción es la preparación y esterilización de los medios que se lleva a cabo también en esta etapa (previamente a la inoculación) ya sea en el tanque de inóculo o en el reactor industrial.
3. Operaciones y proceso de separación y purificación de los productos: estas etapas comprenden en forma general y sucesivamente: a) separación de insolubles por filtración, centrifugación, o decantación; b) separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción, ultrafiltración; c) purificación por extracción líquido-líquido, o extracción a dos fases acuosas, o cromatografía de afinidad, y finalmente d) aislamiento del producto.
4. Tratamiento de efluentes: si bien no tiene una relación directa con el producto, que es la razón de ser de la industria de fermentación, representa una etapa imprescindible porque es fundamental controlar la calidad del efluente que sale de la fábrica y que es enviado generalmente a un curso de agua, sea un canal, arroyo, un río o al mar. Es importante tener en cuenta que todas las etapas de un proceso de fermentación deben estar íntimamente ligadas e integradas ya que es indispensable que el proceso sea optimizado globalmente. Cada etapa debe considerar la importancia e influencia de los procesos y operaciones anteriores y también de los siguientes para poder cumplir con ese concepto de integración. La calidad de una cepa de microorganismo debe estar supeditada a su real capacidad de producción en el fermentador.
Además, el reactor y las condiciones de operación deben ser tales que aseguren la productividad máxima del proceso y la calidad del producto, que en algunos casos depende de las condiciones de operación empleadas como sucede con algunos preparados enzimáticos cuya composición es regulada según como se opere en la etapa de la fermentación y en la correspondiente a la separación y purificación.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. Se propuso una metodología contextualizada a las condiciones de Pastaza para la producción de levaduras como inóculo para las destilerías de la provincia.
2. Se caracterizaron las metodologías para la producción de microorganismos (levaduras) a partir de una vigilancia tecnológica donde se definieron los indicadores bibliométricos y cienciométricos que permitieron seleccionar la metodología para la producción de levaduras.
3. Se desarrolló la metodología para la producción de levaduras en función al contexto de la Amazonía Ecuatoriana. Los pasos de esta metodología se agruparon en función de la escala en la que se producen las levaduras (escala de laboratorio, escala piloto e industrial) y en dependencia a la toma de decisión de satisfacción de la demanda de utilización del inóculo.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Que se realice los estudios de identificación y caracterización morfo-fisiológica y genética de las levaduras utilizadas en el proceso de producción de etanol en las destilerías de la provincia de Pastaza.
2. Que se realice estudios posteriores aplicando la metodología del trabajo para obtener información que se generó con su aplicación y demostrar su validación.

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arango Alzate, B., & Tamayo Giraldo, L. (2012). Vigilancia tecnológica: metodologías y aplicaciones. *Gestión de Las Personas y Tecnología*, (August).
- Ávila-Toscano, J. H., Marengo-Escuderos, A., & Orozco, C. M. (2014). Indicadores bibliométricos, Redes de Coautorías y colaboración institucional en revistas Colombianas de psicología. *Avances En Psicología Latinoamericana*, 32(1), 167–182. <https://doi.org/10.12804/apl32.1.2014.12>
- Carolina, J., & Estrada, B. (2007). Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de.
- Diana Pachón, C., Adriana Pulido, V., & Carlos Moreno, T. (2011). Aislamiento y serotipificación de Salmonella sp. en estanques con *Crocodylus intermedius* y testudines cautivos en Villavicencio - Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 16(2), 2564–2575.
- Elea, P., Toledo, G., & Román, R. (1999). Euroréférentiel I & D: référentiel des compétences des professionnels européens de l'information et documentation, 10, 73. Retrieved from http://eprints.rclis.org/11448/1/Vigilancia_tecnologica.pdf
- Escalante-Minakata, P., & Ibarra-Junquera, V. (2007). Los Cultivos Mixtos y las Fermentaciones Alcohólicas. *BioTecnología*, 11(3), 28–36. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2007_3/Cultivos_Mixtos_Fermentaciones.pdf
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universidad Pontificia Javeriana*, (Tesis doctoral), 24–25.
- García, Noé, Aguilar, María Guadalupe, Libia, Elena, Barradas, Dulce, E. (2017). *PARTIR DE JUGO DE SORGO DULCE [Sorghum bicolor (L .) Moench] Pesca y Alimentación Instituto Nacional de Investigaciones Forestales , Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional del Noreste*.
- Guerra, G., Izurieta, B., & Paez, A. (2009). Escalado de la producción industrial de levadura de panificación usando dos reactores modelo y un bioreactor prototipo. *Biotechnology Advances*, 27, 153–176.
- Isabel, M., Rodríguez, M., Andrés, J., & Suárez, Q. (2005). Maíz como materia prima en

- una planta productora de alcohol etílico., 144.
- Jiménez, R., González, N., Hernández, M., & Ojeda, N. (2014). La caña de azúcar como alimento funcional, *1*(3), 31–39pp. Retrieved from <http://www.panelamonitor.org/media/docrepo/document/files/la-cana-de-azucar-como-alimento-funcional.pdf>
- Moreno, J. R., & Albarracín, V. H. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología). Serie Microbiología. Reduca (Biología). Serie Microbiología*, *5*(55), 79–93. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/963>
- Nieto, H. O. (2009). Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. *Escuela Politécnica Del Ejército*, *15*.
- Ordóñez Ortega, I. V., Rivera Mariño, I., & Franco Mejía, E. (2013). Propuesta de automatización de un proceso de producción de inóculo de levadura a escala industrial para producción de etanol. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*, *13*(1), 40. <https://doi.org/10.19053/1900771X.3415>
- Pérez, E., González-Hernández, J. C., Chávez-Parga, M. C., & Cortés-Penagos, C. (2013). (Desarrollo y aplicación de las ecuaciones de Stefan-Maxwell) FERMENTATIVE CHARACTERIZATION OF PRODUCERS ETHANOL YEAST Stephen Whitaker FROM Agave cupreata JUICE IN MEZCAL ELABORATION. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, *12*(3), 451–461. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v12n3/v12n3a8.pdf>
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Giudici, P., & Castellari, L. (1998). Characterisation of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* hybrids, *20*(6), 543–547.
- Ruiz, S. (2011). Escuela politécnica nacional.
- Sánchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A. I., Muñoz Hernández, J. A., & Rivera Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Tumbaga*, *5*, 61–91. Retrieved from <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/194/163>
- Spinak, E. (1998). SPINAK, E. Indicadores cientificos. *Ciência da Informação*, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. 141-148, maio/ago. 1998., 141–148.
- Suárez-machín, C., Garrido-carralero, N. A., & Guevara-rodríguez, 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.
Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Uribe-Gutiérrez, L., & Gutierrez, L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora. *Pontificia Universidad Javeriana*, 154. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis276.pdf>
- Velasco, B., Eiros Bouza, J. M., Pinilla, J. M., & San Román, J. A. (2012). The use of bibliometric indicators in research performance assessment. *Aula Abierta*, 40(2), 75–84. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3920967&info=resumen&idioma=ENG>
- Wiesner, M., Chen, V., Windle, M., Elliott, M. N., Grunbaum, J. A., Kanouse, D. E., & Schuster, M. A. (2010). Factor Structure and Psychometric Properties of the Brief Symptom Inventory-18 in Women: A MACS Approach to Testing for Invariance Across Racial/Ethnic Groups. *Psychological Assessment*, 22(4), 912–922. <https://doi.org/10.1037/a0020704>
- Yesid, J., Reyes, S., Eduardo, C., & Contreras, L. (n.d.). PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES Y ALCOHOLES A PARTIR DE JUGO DE CAÑA PANELERA, 1–4.
- Zumaqué, L. O., Mantilla, C. L., & Pantoja, M. M. (2009). Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 40–47. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10320/38378>