

Revista Electrónica Nova Scientia

Evaluación de productos de descarte de una
empresa de bebidas no alcohólicas para ser
usados como sustrato fermentable por
Saccharomyces cerevisiae

Evaluation of discard products of a soft drinks
industry to be used as fermentable substrate by
Saccharomyces cerevisiae

L. Matute-Almeida¹, Y. Galindo-Sandoval¹ e I. Delahais²

¹ Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y
Tecnología, Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.
Maracay, Aragua.

² Planta de concentrados Pepsi-Cola Venezuela C.A. y Centro Tecnológico Polar

Venezuela

Resumen

Se evaluaron productos de desecho de la industria de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que estos residuos presentan entre 5,5 a 13% de azúcares. Bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2^3 , se estudió la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*, empleando un medio estéril a base de bebidas no alcohólicas descartadas (cola negra (P) con 12% de azúcar, cafeína, ácido fosfórico y agua carbonatada o una bebida isotónica (G) con 7% de azúcar, ácido cítrico y sales), cuyos pH fueron ajustados a valores de 4 o 4,5. Los medios fueron inoculados con una concentración de 10 g/L de levadura comercial, siendo incubados a 30 °C con agitación constante de 100 rpm o de 130 rpm. Se tomaron muestras cada 2 h, desde la inoculación hasta el tiempo final de fermentación (12 h), midiéndose el contenido de sólidos solubles, la concentración de etanol y la producción de biomasa. El análisis estadístico demostró que el tiempo de incubación y el sustrato influyeron sobre la producción de biomasa ($p < 0,01$). La mayor producción de biomasa bajo las condiciones de estudio, se obtuvo cuando se ajustó el pH inicial a 4,5 y usando 130 rpm como velocidad de agitación para ambos sustratos. Obteniéndose 15,4 g/L de biomasa a las 8 h de incubación en el sustrato P ($p < 0,05$) y 12,8 g/L de biomasa en el sustrato G. Asimismo, se logró la remoción del color de las bebidas y una disminución del 10% en los valores de DQO. Con base en estos resultados se puede señalar que es posible emplear bebidas no alcohólicas descartadas como sustrato fermentable en procesos en donde se inocule, *Saccharomyces cerevisiae*.

Palabras Clave: biomasa, crecimiento, sólidos solubles, fermentación sumergida

Recepción: 15-08-2016

Aceptación: 29-11-2016

Abstract

Waste products from the industry of soft drinks were evaluated to be used as fermentation substrate by *Saccharomyces cerevisiae*, because these residues have between 5.5 to 13% of sugars. Under a completely randomized design with factorial arrangement 23, was studied the kinetics of growth of *S. cerevisiae* using a sterile environment based soft drinks discarded (black cola (P) with 12% sugar, caffeine, phosphoric acid and carbonated water or an isotonic drink (G) with 7% sugar, citric acid and salts), whose pH values were adjusted to 4 or 4.5. The media were inoculated with a concentration of 10 g/L commercial yeast, incubated at 30 ° C with constant shaking of 100 rpm or 130 rpm. Samples were taken every 2 h, from inoculation to final fermentation time (12 h), were measured the soluble solid content, the ethanol concentration and the biomass production. Statistical analysis showed that the incubation time and substrate influenced the biomass production ($p < 0.01$). The major production of biomass under the study conditions, was obtained when the initial pH was adjusted to 4.5 and was used 130 rpm as stirring speed for both substrates. Being obtained 15.4 g/L of biomass at 8 h of incubation in the substrate P ($p < 0.05$) and 12.8 g/L of biomass in the substrate G. Also, the color removal drinks and 10% decrease in COD values was achieved. Based on these results it can be stated that it is possible to use non-alcoholic discard beverages as fermentable substrate in processes where it is inoculated, *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: biomass, growth, soluble solids, submerged fermentation 5

Introducción

Los refrescos son bebidas populares que consisten principalmente en agua carbonatada, azúcar y saborizantes, con un consumo mundial de más de 534 mil millones de litros al año (Euromonitor internacional, 2013, 2). Aun cuando las bebidas gaseosas siguen dominando el mercado global de bebidas, su cuota de mercado está disminuyendo. Esto a consecuencia del rápido crecimiento en volúmenes de consumo de las bebidas funcionales (entre las que se encuentran las bebidas isotónicas o deportivas) y el agua mineral embotellada. En 2008, las bebidas funcionales alcanzaron ventas globales de 26,9 mil millones de dólares, con una tasa de crecimiento promedio de 15 a 20% anual (Shanker *et al.*, 2012, 23; Corbo *et al.*, 2014, 1196).

La no conformidad de los parámetros normados para estas bebidas no alcohólicas es la principal causa su descarte en Venezuela, tales como: la falta de gas, el cumplimiento de la fecha de caducidad, las fallas en el envasado y los errores en el etiquetado (Covenin, 1995, 5). Este descarte representa un promedio de 700.000 L mensuales de residuos líquidos, con un contenido de azúcares simples que van desde 5,5 a 12% (P/V) y una elevada Demanda Química de Oxígeno o DQO (entre 70.000 y 126.000 mg O₂/L) (Woodard, 2001, 120; Coombes, 2005, 101; Taylor, 2006, 53; Empresas Polar, 2014, 5; Galindo, 2014, 30). En consecuencia, es de interés emplear microorganismos capaces de usar estos desechos como fuente energética en procesos fermentativos para sintetizar nuevos compuestos de valor comercial, tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual es capaz de metabolizar azúcares simples y adicionalmente reducir los costos derivados del manejo de estos residuos, disminuyendo el impacto ambiental de los mismos (Obeta *et al.*, 2009, 78; Nuruddin *et al.*, 2011, 347; Otero *et al.*, 2011, 272; Saval, 2012, 15; Vidhyalakshmi *et al.* 2012, 56). Es por ello que en esta investigación se evaluaron productos de desecho de la industria de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *S. cerevisiae*.

Método

Micrororganismos

El material biológico que se empleó en el ensayo fue una levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, de la marca comercial *Saf Instant Dorado*® (Lesaffre Yeast Corporation, Milwaukee, USA).

Medio de cultivo.

Se realizaron pruebas experimentales utilizando como sustrato fermentable líquido, dos bebidas no alcohólicas descartadas: una cola negra identificada como P y una bebida isotónica con sabor a naranja, designada como G (ambas bebidas descartadas, fueron suministradas por la Planta de concentrados Pepsi-Cola Venezuela, C.A., Venezuela). La bebida isotónica (G) presentó en su composición, principalmente: ácido cítrico, sales y 7% de azúcares. Mientras que la cola negra (P) era una bebida a base de: agua carbonatada, ácido fósfórico, cafeína y 12% de azúcares.

La cola negra se acondicionó para ser empleada como sustrato, retirando el CO₂ de la misma, mediante la inyección de aire empleando un aireador y evitando así la interferencia de este gas en la medición de algunos parámetros como el contenido de sólidos solubles. Seguidamente, se ajustó el pH de ambos residuos hasta los valores fijados para éste estudio (4 o 4,5). Se trasvasaron 100 mL de las bebidas de descarte en matraces de 500 mL de capacidad y se esterilizaron a 121 °C durante 15 mi, empleando para ello, un autoclave Marca Napco Model 8000- DSE, Thermo Electron Corporation, USA (Matute *et al.*, 2014, 50).

Proceso de fermentación.

Una vez los tratamientos alcanzaron la temperatura ambiente (30 °C), se inocularon con 10 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* y se incubaron a 30 °C durante 12 horas a dos velocidades: 100 o 130 rpm para favorecer la fermentación aerobia, empleando para ello un agitador Precision Scientific Modelo 66722 Dubnoff Metabolic Incubator, USA (Gualtieri y Sánchez, 2003, 19; Gualtieri *et al.*, 2007, 5). Se efectuó la toma de muestras durante las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h de incubación.

Tratamiento de las muestras.

Las muestras fueron filtradas utilizando una bomba a vacío (Marca Thomas Scientific, Modelo DOA-9104E-AA, USA), conectada a filtro y membrana filtrante Millipore de 0,2 µm de peso conocido, en el que fue retenida la biomasa de *S. cerevisiae*. Mientras que en el *kitasato* se recogió el líquido fermentado clarificado (Bar-Shimon *et al.*, 2014, 141).

Determinación de biomasa.

Los sólidos retenidos en el filtro se sometieron a secado a 100 °C, en una estufa Precision Scientific modelo 25-EG, USA, hasta alcanzar peso constante, determinando la biomasa expresada en gramos (Gualtieri y Sánchez, 2003, 19; Gualtieri *et al.*, 2007, 5).

Determinación de sólidos solubles, alcohol, densidad y grado de fermentación

La determinación de la concentración de sólidos solubles, el contenido de alcohol, la densidad y el grado de fermentación de los medios de cultivo, se llevó a cabo a través del análisis del líquido clarificado obtenido de cada filtración según los tiempos de incubación señalados. Para conocer la concentración de sólidos solubles se empleó un Hidrómetro Brix, marca Brannan, Inglaterra (Covenin, 1995,1). Los 50 mL del líquido clarificado a tubos de ensayo que se colocaron en el disco rotatorio de un densímetro Alcoalyzer Plus Anton Parr, modelo Beer (USA), el cual giro durante 3 minutos a 20 °C de temperatura, se determinó el contenido de alcohol en V/V y P/V en las muestras (Okon y Nwabueze, 2009, 218), la densidad en g/cm³ (Páez *et al.*, 2009, 48) y el grado de fermentación (expresado en porcentaje) en las muestras analizadas (Shengli *et al.*, 2009, 372).

Determinación de color.

El color de las bebidas no alcohólicas descartadas tanto antes como luego de la fermentación fue medido por espectrofotometría. Se empleó una longitud de onda de 425 nm para medir el color amarillo de G, mientras que para P se efectuaron las lecturas a 610 nm por el empleo de color caramelo (Kamuf *et al.*, 2003, 65; Empresas Polar, 2011, 17; Sha *et al.*, 2014, 2).

Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).

La valoración de la demanda química de oxígeno se realizó empleando el método de digestión por reactor usando viales de dicromato (sin mercurio). Se agregaron 2 mL del líquido clarificado a viales de digestión de DQO 20-1500 mgO₂/L, se colocaron los viales en el equipo Themoreactor Merck TR 300 (Alemania) por 2 h a una temperatura de 150 °C, transcurrido el tiempo se dejó enfriar hasta 20 °C se midió la concentración de DQO en mg de O₂/L (ppm O₂) por colorimetría a través de un colorímetro (marca Hach, modelo DR/890, USA) (Gargouri *et al.*, 2013, 33).

Determinación de la velocidad de crecimiento.

Se empleó el método de turbidimetría, el cual se basa en la medición de la cantidad de luz dispersa a través del cultivo bacteriano, haciendo diluciones del caldo de fermentación en agua destilada utilizando un factor de 1:9, midiendo la absorbancia de la dilución en un espectrofotómetro (marca *Spectronic Instruments*, modelo Genesys 4001/4, USA) a una longitud de onda de 640 nm, construyendo la curva de calibración con los valores obtenidos a través de las lecturas (Muñoz y Catrilaf, 2013, 7). El crecimiento microbiano fue estudiado siguiendo el modelo Monod para un sistema discontinuo (Jakyme *et al.*, 2001, 55).

El valor velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) se obtuvo a partir de la pendiente máxima de la curva de crecimiento del microorganismo, expresándose en h^{-1} (Ramírez y Molina, 2005; Rivera *et al.*, 2005). Así mismo, se determinó el rendimiento (Y) a través de la línea de tendencia empleando la ecuación $Y=mX+b$, expresando la razón entre la producción de biomasa y el agotamiento del sustrato o azúcares totales (Ramírez y Molina, 2005; Muñoz y Catrilaf, 2013).

Análisis estadístico.

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado, con arreglo factorial 2^3 con dos réplicas, cuyo análisis muestra la interacción entre los factores empleados (Camacho-Ruiz *et al.*, 2003, 533; Gutiérrez y de la Vara, 2008, 183) y en donde se estudiaron los siguientes factores y niveles: agitación (100 y 130 rpm), pH (4 y 4,5) y bebida descartada (bebida isotónica y cola negra). Con los datos recolectados se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA, $\alpha=0,05$) con la finalidad de determinar si las interacciones eran estadísticamente significativas o no y se aplicó la prueba de comparación de medias de las mínimas diferencias significativas (LSD) (Gutiérrez y de la Vara, 2008, 74). Finalmente, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la distribución normal de la data empleada y comprobar la validez de ajuste del coeficiente de determinación, R^2 (Gutiérrez y de la Vara, 2008, 85, 178). La información recopilada fue procesada con los programas informáticos IBM© SPSS® Statistics versión 20, USA (2011).

Resultados y Discusión

Estudio de la cinética del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en los productos de desecho de la industria de bebidas no alcohólicas usados como sustrato fermentable.

En la Figura 1, se puede apreciar el comportamiento de *S. cerevisiae* (SC) en el transcurso de la fermentación. La mayor producción de biomasa bajo las condiciones de estudio, se obtuvo cuando se ajustó el pH inicial a 4,5 y usando 130 rpm como velocidad de agitación para ambos sustratos. Bajo estas condiciones, SC alcanzó 15,4 g de biomasa/L en 8 h de fermentación empleando P como sustrato ($P < 0,05$) y al degradar el medio líquido G, generó 12,8 g de biomasa/L en 6 h de incubación. Asimismo, se verificó que después de que en cada tratamiento se alcanzó la máxima producción de biomasa, está disminuyó. Al respecto, Maragatham y Panneerselvam (2011, 16) y Amata (2013, 166) atribuyen este comportamiento a la reducción de nutrientes disponibles en el sustrato una vez alcanzado el máximo crecimiento celular (Figura 2).

En este ensayo, la mayor producción de biomasa se obtuvo cuando se empleó el refresco de cola negra descartado (P) como sustrato, el cual presentó un contenido inicial de azúcar del 12%, coincidiendo con lo indicado por Montañez *et al.* (2011, 7), Quienes señalan que a causa de su naturaleza poco osmotolerante, SC lograr un mayor crecimiento cuando el sustrato presenta concentraciones de azúcares menores al 15%. En tanto que en las fermentaciones llevadas a cabo usando G, se produjo el menor crecimiento celular (Figura 1), esto puede atribuirse a la menor concentración inicial de azúcares en G (7%), ya que se ha reportado que una concentración de azúcares iniciales entre 10 y 15% favorece la productividad de estos microorganismos (Arifa *et al.*, 2010, 73; Dhanasekeran *et al.*, 2011, 28).

Evaluación de productos de descarte de una empresa de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*

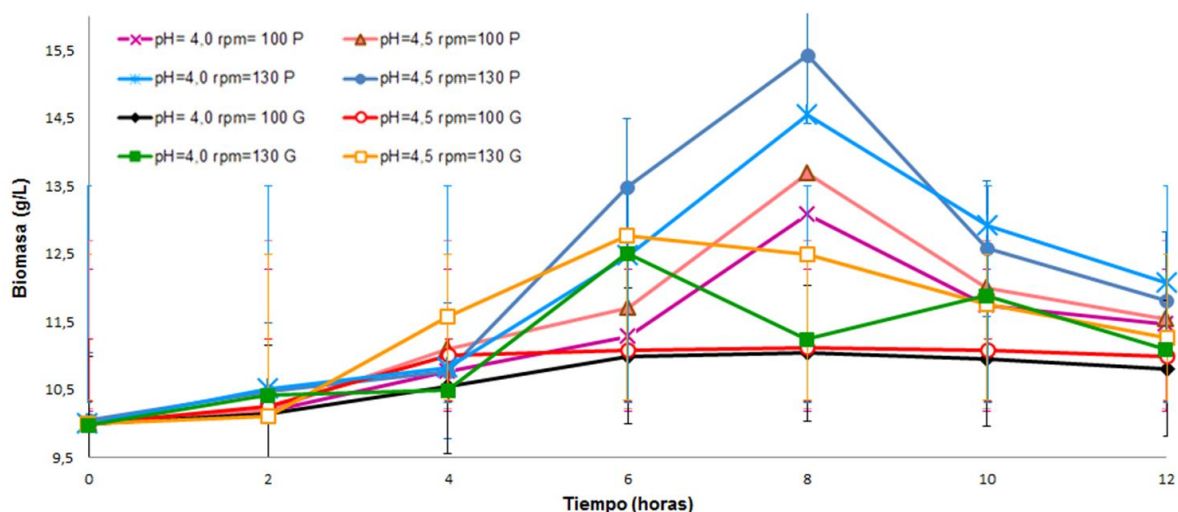


Figura 1. Producción de biomasa (g/L) llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* en los diferentes tratamientos estudiados.

La disminución en la concentración del sustrato disponible (azúcares) observado en la Figura 2 es confirmado por los resultados registrados en la Figura 3, en la que se muestra que SC consumió el 90% de los azúcares presentes en el sustrato P (refresco de cola negra descartado). Mientras que en los tratamientos usando G como medio de cultivo, el grado de fermentación fue del 80%. Estos resultados, son similares a los reportados por Ferreyra *et al.* (2009,

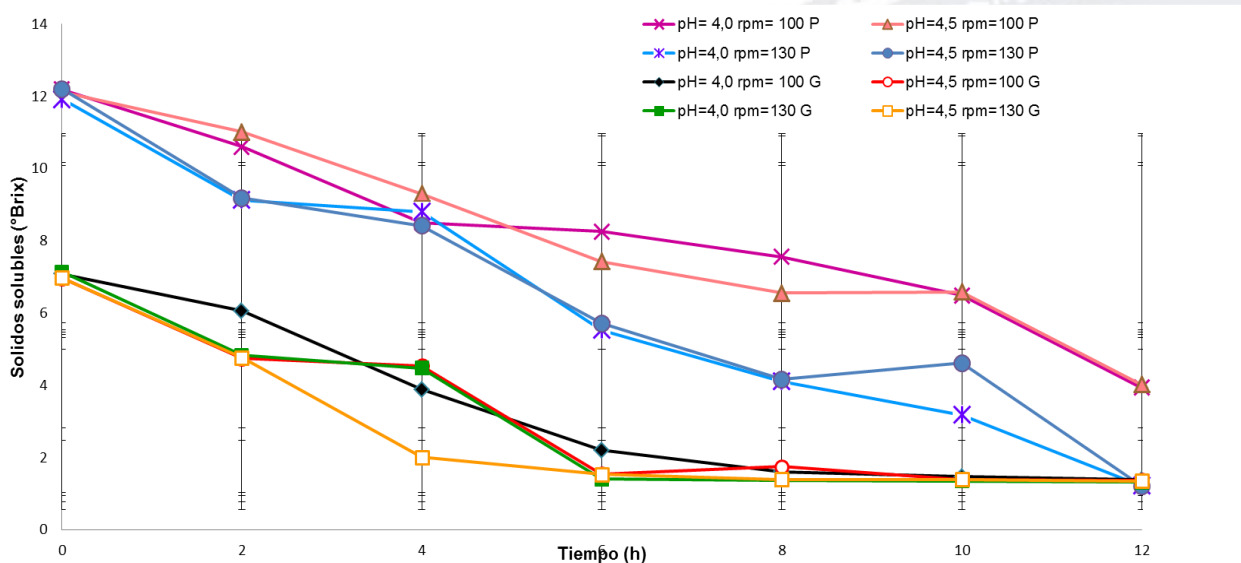


Figura 2. Cinética del consumo de los sólidos solubles (°Brix) durante la fermentación llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* en los tratamientos estudiados.

151), Ton *et al.* (2010, 745), Maragatham y Panneerselvam (2011, 16), y Amata (2013, 166), quienes apuntan que la disminución de los sólidos solubles en el sustrato fermentado (Figuras 2 y 3), es consecuencia del consumo de los mismos durante el proceso de oxidación respiratoria llevado a cabo por SC para la obtención de biomasa (Figura 1), así como para la conversión del alcohol (Figura 4) ocasionando la disminución del pH en el medio de cultivo (Cuadro 1).

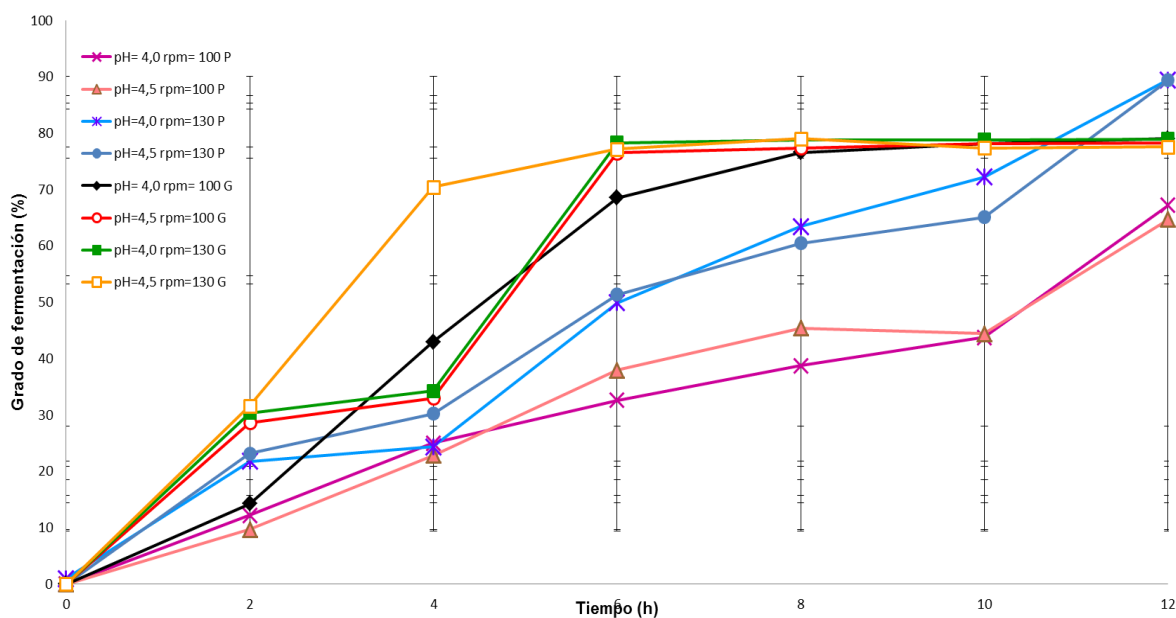


Figura 3. Cinética del Grado de fermentación (%) llevado a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* en los tratamientos estudiados.

Con respecto a la producción de etanol llevada a cabo por SC durante el proceso fermentativo estudiado (Figura 4), se obtuvo la mayor concentración de alcohol etílico en el residuo P, usando la mayor velocidad de agitación (130 rpm) y un pH inicial de 4,5 (6,3% P/V). Este resultado se asemeja a lo señalado por Arifa *et al.* (2010, 73) y Serna *et al.* (2013, 119), quienes reportaron hasta 6,7% P/V de etanol. Por el contrario, la menor concentración de alcohol medida en este ensayo fue de 3,3% P/V, valor obtenido en el tratamiento que empleó G como sustrato a un pH inicial de 4,0 y con 100 rpm de agitación. Según Arifa *et al.* (2010, 73), este resultado puede atribuirse a la menor concentración inicial de azúcar en el sustrato a fermentar.

Evaluación de productos de descarte de una empresa de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*

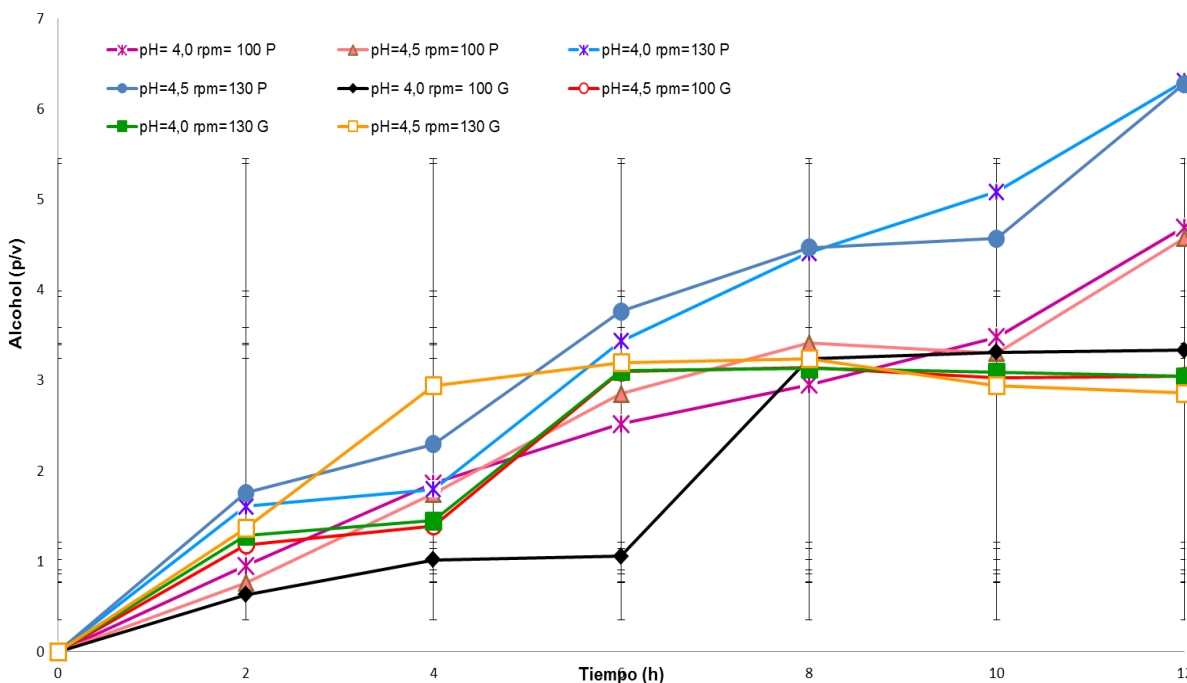


Figura 4. Producción de alcohol (P/V) llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* en los tratamientos estudiados

Asimismo, se observó que durante el proceso de crecimiento de SC con la consecuente producción de etanol, los valores de pH disminuyeron (Cuadro 1) en el sustrato fermentado, probablemente a consecuencia del consumo de los azúcares contenidos en el medio (Arifa *et al.*, 2010, 73; Blanco *et al.*, 2012, S235).

Con base en los resultados obtenidos a través de las cinéticas evaluadas para lograr la descripción cuantitativa de los efectos de las diferentes variables propuestas sobre el crecimiento de SC, se aplicó un ANDEVA (Cuadro 2). El estudio estadístico demostró que el sustrato empleado en las fermentaciones y la velocidad de agitación influyeron de forma altamente significativa ($p < 0,01$) sobre el proceso de obtención de la biomasa microbiana.

Cuadro 1. Variación del pH durante la fermentación llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* en los tratamientos estudiados.

Tiempo (h)	pH 4,0				pH 4,5			
	100 RPM		130 RPM		100 RPM		130 RPM	
	P	G	P	G	P	G	P	G
0	4,00±0E ⁻⁷	4,00±0E ⁻⁷	4,00±0,007	4,00±0E ⁻⁷	4,50±0E ⁻⁷	4,50±0E ⁻⁷	4,50±0E ⁻⁷	4,50±0E ⁻⁷
2	3,43±0,05	3,87±0,05	3,44±0,084	3,82±0,007	3,39±0,001	4,04±0,06	3,46±0,042	4,16±0,064
4	3,30±0,028	3,77±0,07	3,38±0,063	3,78±0E ⁻⁷	3,35±0,021	4,07±0,014	3,41±0,007	3,97±0,007
6	3,28±0,030	3,71±0,021	3,27±0,028	3,76±0,014	3,27±0,028	3,94±0,007	3,34±0,064	4,00±0,007
8	3,27±0,007	3,7±0E ⁻⁷	3,29±0,014	3,75±0,007	3,25±0,014	3,95±0E ⁻⁷	3,15±0,006	3,86±0,006
10	3,14±0,013	3,60±0,028	3,19±0,042	3,65±0,014	3,26±0,042	3,91±0,015	3,16±0E ⁻⁷	3,88±0,028
12	3,05±0,013	3,58±0,05	3,17±0,029	3,61±0,007	3,19±0,030	3,89±0,015	3,11±0,007	3,84±0,010

Cuadro 2. Análisis de varianza para la producción de biomasa.

Fuente	Suma de cuadrados	de gl	Cuadrados medios	F	P
Tipo de bebida	0,126	1	0,126	9,661	0,002
pH	0,120	1	0,120	0,946	0,333
Agitación	0,099	1	0,099	7,640	0,007
Tipo de bebida*pH	6,542.10 ⁻⁵	1	6,54.10 ⁻⁵	0,005	0,944
Tipo de bebida*Agitación	0,001	1	0,001	0,049	0,826
pH*Agitación	9,80.10 ⁻⁵	1	9,80.10 ⁻⁵	0,008	0,931
Tipo de bebida*pH*Agitación	0,001	1	0,001	0,101	0,751
Error	1,353	104	0,13		
Total	145,256	112			

De acuerdo Arifa *et al.* (2010, 76), la condición aeróbica es necesaria para lograr el crecimiento de la levadura a través de la biosíntesis de grasas y lípidos poliinsaturados necesarios en la mitocondria y la membrana plasmática. Por el contrario, la deficiencia de oxígeno restringe el crecimiento, reduce la viabilidad de la levadura y ocasiona una fermentación lenta e incompleta. De igual forma, estos autores señalan que la concentración inicial de azúcares en el sustrato es un factor relevante en la producción de proteína unicelular de SC. Por otra parte, las pruebas aplicadas mostraron que en esta experiencia, el pH inicial no afectó significativamente el proceso

fermentativo ($p > 0,05$), coincidiendo con los resultados obtenidos por Ramírez y Molina (2005, 96).

En síntesis, se puede afirmar que bajo las condiciones en las que fue llevado a cabo este ensayo la producción de biomasa de *S. cerevisiae* fue favorecida por el contenido de azúcar inicial del sustrato fermentable y la circulación de aire suministrada a través de la agitación.

Adicionalmente, es importante destacar que durante el proceso fermentativo, se registró la clarificación de las bebidas no alcohólicas descartadas empleadas como sustratos, con un 80% de remoción en el color (Figura 5), demostrándose la capacidad de *S. cerevisiae* como biosorbente. Es decir, que *S. cerevisiae* capta compuestos a través de mecanismos fisicoquímicos (transferencia de masa), en donde se involucran una fase sólida (adsorbente) y una fase líquida (disolvente) que contiene el compuesto que será adsorbido (adsorbato) (Barreda-Reyes *et al.*, 2015, 217). Esto coincide con el estudio efectuado por Mahmoud (2014, 10), quien reseñó la capacidad de *S. cerevisiae* para la eliminación de colorantes como el azul de remazol bajo condiciones de pH, temperatura y agitación controladas; y el trabajo de Barreda-Reyes *et al.* (2015, 225), quienes reportan que *S. cerevisiae* la es capaz de biosorber el colorante azoico naranja ácido 10 a pH 2.



Figura 5. Remoción de color por *Saccharomyces cerevisiae* en los tratamientos en los que se empleó cola negra de descarte como sustrato fermentable.

Modelización de la cinética del crecimiento de Saccharomyces cerevisiae en proceso discontinuo.

Fijadas las condiciones óptimas que favorecieron la producción de biomasa de SC en los sustratos estudiados, se determinaron los parámetros cinéticos de los procesos en discontinuo (Cuadro 3). Los ensayos demostraron que el tiempo óptimo de generación de biomasa fue de 8 h en P y de 6 h con G como sustrato, con un crecimiento aproximado de la biomasa de 60 y 30% más, respectivamente, durante los tiempos de generación señalados. En cuanto a las velocidades específicas determinadas en los procesos biotecnológicos realizados para cada bebida descartada en condición óptima de crecimiento, éstas se aproximaron a la de $0,38 \text{ h}^{-1}$ reportada por Ramírez y Molina (2005, 100), para el crecimiento de *S. cerevisiae* en agua de coco en un proceso en discontinuo. Mientras que los valores obtenidos para el rendimiento (Y) de SC en los ensayos efectuados, estos fueron menores al 1,69 g de levadura/g de azúcar obtenido por Ramírez y Molina (2005, 100).

Cuadro 3. Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* en bebidas no alcohólicas descartadas.

Parámetro.	P	G
Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})	0,41	0,39
Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{max} (h^{-1})	0,45	0,45
Rendimiento, Y (g levadura/ g azúcar)	1,38	1,37

Asimismo, se verificó la correlación entre la producción de biomasa y el consumo de azúcares del medio, al respecto se obtuvo un coeficiente de determinación R^2 de 0,87 en ambos sustratos (Figura 6), lo cual indica que la producción de biomasa es explicada en un 87% por la concentración azúcares disponibles en el sustrato para consumo durante la fase de crecimiento exponencial de SC (Díaz, 2009, 196). Asimismo, la Prueba de Shapiro-Wilk demostró que los datos presentan una distribución normal ($p > 0,05$), por lo que se considera que el 87% de los valores de biomasa pueden ser predichos o explicados a través de la recta de regresión ajustada (Bernal, 2013, 21).

Finalmente, los análisis efectuados para medir la reducción de los valores de DQO en las bebidas empleadas como sustrato fermentable, se llevaron a cabo en los tratamientos con mayor producción de biomasa para cada bebida descartada, registrándose una disminución de

aproximadamente 10% del DQO en los líquidos fermentados al comparárseles con los DQO de las bebidas no alcohólicas antes de la fermentación en un máximo de 8 h incubación (Cuadro 4). La reducción en el DQO en procesos con SC fue reportada por: Menegatti *et al.* (2013, 161), quienes después de 24 h de fermentación, obtuvieron un DQO 27,65% menor al DQO inicial; así como por Singh *et al.* (2011, 213), en cuyo estudio se observó 40% de remoción del DQO al quinto día del cultivo.

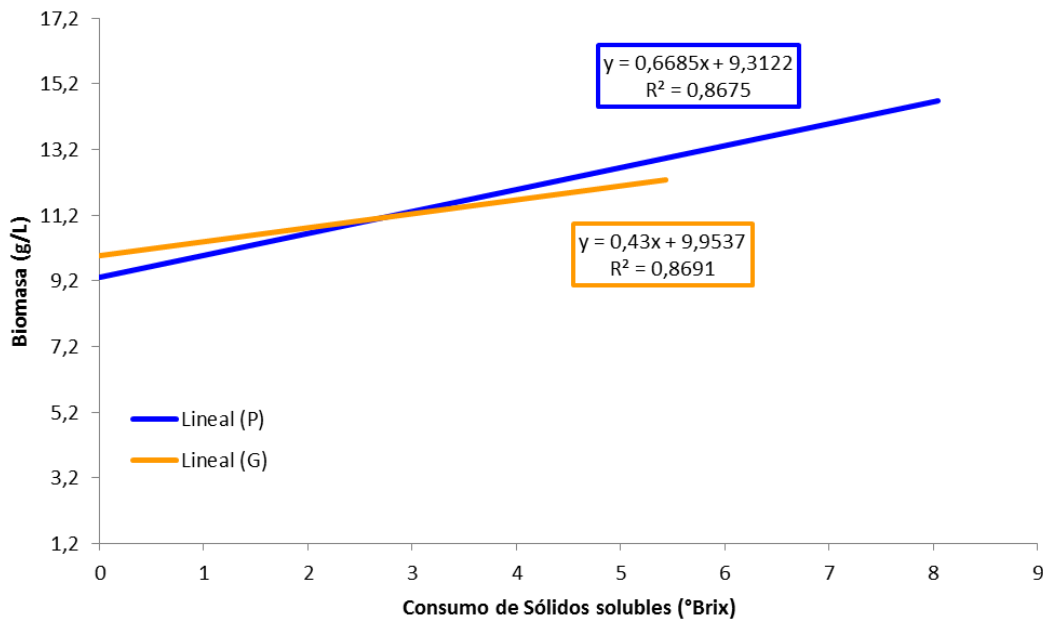


Figura 6. Producción de Biomasa con respecto al consumo de solidos solubles del sustrato.

Cuadro 4. Demanda química de oxígeno (DQO) en bebidas no alcohólicas descartadas.

Bebida	DQO (ppm) antes de fermentar	DQO (ppm) líquido fermentado	Tiempo de fermentación (h)
P	126.000±2000,00	113.200±1803,71	8
G	70.600±2715,38	64.000±2309,40	6

Conclusiones

Bajo las condiciones en las que fue llevado a cabo este trabajo, se concluye que pueden emplearse las bebidas no alcohólicas descartadas en procesos fermentativos para la obtención de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, (15,4 g/L de biomasa a las 8 h de incubación en el

sustrato P y 12,8 g/L de biomasa en el sustrato G a las 6 h de fermentación) y etanol. Finalmente, se determinó que la fermentación de estos residuos permitió la remoción del color de las bebidas descartadas empleadas y reducir en 10% el DQO de las mismas, lo que conlleva a un beneficio para el ambiente.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo Sr. Eduardo Rodríguez (Planta de Concentrados Pepsi-Cola Venezuela C.A.) y al Centro Tecnológico Polar ubicado en cervecería Polar por su apoyo técnico.

Referencias

Amata, I. (2013). Yeast a single cell protein: Characteristics and metabolism. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 4: 158-170.

Arifa, T., A. Madiha, F. Tasnim. (2010). Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Saccharomyces cerevisiae* BIO-07. *Journal of Applied Pharmacy*. 3: 72-78.

Bar-Shimon, M., H. Yehuda, L. Cohen, B. Weiss, A. Kobeshnikov, A. Daus, M. Goldway, M. Wisniewski, S. Droby. (2004). Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*. 45: 140-148.

Barreda-Reyes, K.L., E. I. Mendoza-Calderón, A. E. Ortega-Regules, M. L. Martínez-de-Santos, A. R. Netzahuatl-Muñoz. (2015). Biosorción de colorante naranja ácido 10 por biomasa de levadura aislada de suelo contaminado. *Revista Cubana de Química*. 27: 216-227.

Bernal, E. (2013). *Bioestadística Básica para Investigadores con SPSS*. Bubok-Literary Criticism. 105 p.

Blanco A., M. Quicazán, M. Cuenca. (2012). Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 19: S234-S236.

Camacho-Ruiz, L., N. Pérez-Guerra, R. Pérez Roses. (2003). Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid state fermentation. *Electronical Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2: 531-542.

Comelli, R., L. Seluy, I. Grossmann, M. Isla. (2015). Treatment of High-Strength Wastewater from the Sugar-Sweetened Beverage Industry by an Alcoholic Fermentation Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. ACS Publications. 54: 7687-7693.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1995). *Bebidas Gaseosas*. Norma 762. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas. Venezuela. 27 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1995). *Bebidas Gaseosas*. Norma 2182. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas. Venezuela. 8 p.

Coombes, J. (2005). Sports drinks and dental. *American Journal of Dentistry*. 18: 101-104

Corbo, M., A. Bevilacqua, L. Petrucci, F.P. Casanova, M. Sinigaglia. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods Commercial Trends, Research, and Health Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13: 1192-1206.

Dhanasekeran, D., S. Lawanya, S. Saha, N. Thajuddin, A. Panneerselvam. (2011). Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 8: 26-32.

Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos*. Colección Ciencia y Tecnología. 2da edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 286 p.

Dickinson, J. R., M. Schweizer. (2004). *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*, second ed., CRC Press, USA. 459 p.

Empresas Polar. (2011). *Manual de control de calidad de Pepsi-Cola Venezuela*. Venezuela. 25 p.

Empresas Polar. (2014). *Estadísticas de producción y descarte de Pepsi-Cola Venezuela*. Venezuela. 11 p.

Euromonitor Internacional. (2013). *Coca-Cola CO The, swot analysis, in soft drinks (world)*. Passport. 45 p.

http://www.euromonitor.com/medialibrary/PDF/Coca-Cola-Co_SWOT_Analysis.pdf (26 de marzo 2016).

Ferreyra M., M. Schvab, L. Gerard, L. Zapata, C. Davies, R. Hours. (2009). Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista de ciencias, docencia y tecnología*. 20(39):143-158.

Galindo, Y. (2014). Evaluación de productos de desecho de una empresa de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Venezuela. 39 p.

Gargouri, O., Y. Samet, R. Abdelhedi. (2013). Electrocatalytic performance of PbO films in the degradation of dimethoate insecticide. *Journal of Ethiopian Medical Practice*. 39: 31-37

Gualtieri, M., J. Sánchez. (2003). Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz precocida (*Zea mays*). *Revista de la Facultad de Farmacia*. 45: 17-22.

Gualtieri, M., C. Villalta, L. Díaz, G. Medina, E. Lapenna, M. Rondón. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces Cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 38: 1-12.

Gutiérrez P., H., R. de la Vara S. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos*. Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 545 p.

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66: 300–372.

Kamuf, W., A. Nixon, O. Parker, G.C. Barnum Jr. (2003). Overview of caramel colors. *Cereal Foods World*. 48: 64-69.

Mahmoud, M.S. (2014). Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. *HBRC Journal*. 1-11. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687404814000649> (11 de septiembre de 2105).

Maragatham, C., A. Panneerselvam. (2011). Production of Single Cell Protein from Yeast using Papaya Extract Medium. *Pelagia Research Library. Advances in Applied Science Research*. 2: 14-18.

Matute, L., A. Bertsch, I. Díaz. (2014). Characteristics of enzymatic additives obtained from cultures *Aspergillus niger* ANM-1 in submerged and solid state. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia*. 37: 48-56.

Menegatti, S., S. Damasceno, K. Sene, S. Machado, A. Barana, M. Pascoli, D. Christ, J. Piechontcoski. (2013). Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 11: 158-163.

Montañez J., J. Victoria, R. Flores, M. Vivar. (2011). Fermentación de los fructanos del *Agave tequilana* Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. Revista de información tecnológica. 22: 3-14.

Muñoz M., G. Catrilaf. (2013). Estimación de parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en sistema de fermentación batch bajo distintas condiciones de crecimiento. http://www.researchgate.net/publication/257310255_Estimation_of_kinetic_parameters_of_Saccharomyces_cerevisiae_in_batch_fermentation_during_different_growth_conditions (20 de agosto de 2014).

Nuruddin, M., A. Chowdhury, S.A. Haque, M. Rahman, S.F. Farhad, M. Sarwar, A. Quaiyyum. (2011). Extraction and characterization of cellulose microfibrils from agricultural wastes in an integrated biorefinery initiative. Cellulose Chemistry and Technology. 45: 347-354.

Obeta, J., B. McNeil, L. Harvey. (2009). Production of Protein-Enriched Feed Using Agro-Industrial Residues as Substrates. In: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Utilisation of Agro-Residues. Oinam Singh nee Nigam y Ashok Pandey Editors. Springer Science+Business Media B.V., Netherlands. pp. 77-104.

Okon, A. A., T.U. Nwabueze. (2009). Simultaneous effect of divalent cation in hydrolyzed cassava starch medium used by immobilized yeast for ethanol production. African Journal of Food Science. 3: 217-222.

Otero, M., I. Guerrero, J. Wagner, A. Cabello, P. Sceni, R. García, J. Soriano, A. Tomasini, G. Saura, O. Almazán (2011). Yeast and its derivatives as ingredients in the food industry. Biotecnología Aplicada. 28: 271-275.

Ramírez, O., M. Molina. (2005). Evaluación de parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. Ingeniería. 15: 91-102.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. Biotecnología. 16: 14-46

Sha, O., X. Zhu, Y. Feng, W. Ma. (2014). Determination of sunset yellow and tartrazine in food samples by combining ionic liquid-based aqueous two-phase system with high performance liquid chromatography. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2014: 1-8.

Shanker, A.S., A. Kodparthi, P.K. Pindi. (2012). Microbial diversity in soft drinks. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation. 1: 23-26.

Shengli, Y., L. Zhongshan, C. Shengzhou, H. Sheng, M. Qingwei, L. Congcong, L. Yi, H. Guoqing. (2009). Production of Beer with a Genetically Engineered Strain of *S. cerevisiae* with Modified Beta Glucanase Expression. *Journal of The Institute of Brewing*. 115: 361-367.

Singh, J., R. Meshram, D. Ramteke. (2011). Production of Single cell protein and removal of 'COD' from dairy waste water. *Pelagia Research Library*. 1: 209-215.

Taylor, B. (2006). Ingredients and formulation of carbonated soft drinks. En: *Carbonated Soft Drinks: Formulation and Manufacture*. Edited by David P. Steen and Philip R. Ashurst, 48-86. Blackwell Publishing Ltd. United Kingdom.

Ton, N.M.N., M.D, Nguyen, T.T.H. Pham, V.V.M. Le. (2010). Influence of initial pH and sulfur dioxide content in must on wine fermentation by immobilized yeast in bacterial cellulose. *International Food Research Journal* 17: 743-749.

Vidhyalakshmi, R., C. Vallinachiyar, R. Radhika. (2012). Production of Xanthan from Agro-Industrial Waste. *Journal of Advanced Scientific Research*. 3: 56-59.

Woodard, F. (2001). *Industrial Waste Treatment Handbook*. Butterworth–Heinemann Eds. United States of America. 477 p.