



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Diseño de un turbidímetro portátil acoplado a un
smartphone para la caracterización del crecimiento de
microorganismos**

T E S I S

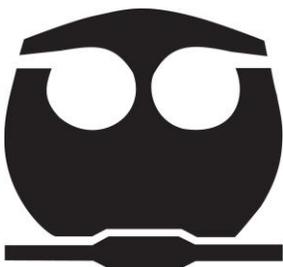
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

MIGUEL ÁNGEL CASTRO ROSALES

TUTOR

MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR



Ciudad Universitaria, CDMX

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

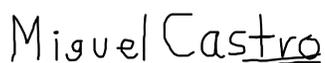
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MONTIEL AGUIRRE JESUS FERNANDO
VOCAL: Profesor: AVILA CHAVEZ EUCLIDES
SECRETARIO: Profesor: GUTIERREZ AGUILAR MANUEL
SUPLENTE 1: Profesora: CAMACHO DE LA ROSA NORMA ANGELICA
SUPLENTE 2: Profesora: MUÑOZ CLARES ROSARIO ADELAIDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Facultad de Química y en la casa del sustentante, bajo la dirección y tutela del Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar.

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica
Edificio E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán, CDMX. C.P. 04510
México



Miguel Ángel Castro Rosales
(Sustentante)



Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
(Asesor)

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química UNAM.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA208121 “Caracterización del transporte de calcio mitocondrial en la fisiología de *Arabidopsis thaliana*”.

A los honorables miembros del jurado, por revisar el presente trabajo de tesis y por su apreciable participación en el examen profesional.

Agradecimientos Institucionales

Al Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por su asesoramiento en el presente trabajo de tesis y por su apreciable participación en el examen profesional.

Al Laboratorio 115 del Conjunto E de la Facultad de Química UNAM.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química UNAM.

¡GRACIAS!

Contenido

Lista de Abreviaturas y Definiciones	7
Índice de ecuaciones, tablas, figuras y gráficas	9
Resumen	11
1. Antecedentes	12
1.1 Métodos de cuantificación de microorganismos	12
1.2 Turbidez y turbidimetría	12
1.3 Absorbencia, transmitancia y densidad óptica	14
1.4 Funcionamiento de un turbidímetro	15
1.5 Ventajas y desventajas de los turbidímetros	16
1.6 La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como microorganismo modelo para estudios de crecimiento microbiano	17
2. Planteamiento del Problema	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	23
5. Objetivos particulares	23
6. Materiales	24
6.1 Material biológico	24
7. Metodología y procedimiento experimental	25
7.1 App móvil “sensor de luz”	25
7.2 Programación de la App	25
7.3 Diseño de la interfase de medición	32
7.4 Preparación de medios de cultivo	35
7.4.1 Preparación de caldo papa sacarosa al 1 % m/v	35
7.4.2 Preparación de Hidromiel al 5 % v/v	36
8. Resultados	37
8.1 Interfase gráfica de la App y pruebas de medición	37

8.2 Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medios de cultivo	39
8.3 Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>. Pruebas piloto	41
8.3.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v	42
8.3.2 Crecimiento en Hidromiel al 5 % v/v	44
8.4 Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>. Pruebas finales	46
8.4.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v	47
8.4.2 Crecimiento en hidromiel al 5 % v/v	49
9. Discusión	51
9.1 Interfase gráfica de la app y pruebas de medición	51
9.2 Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medios de cultivo	60
9.3 Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> . Pruebas piloto	69
9.3.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v	78
9.3.2 Crecimiento en hidromiel al 5 % v/v	78
9.4 Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> . Pruebas finales	79
9.4.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v	80
9.4.2 Crecimiento en Hidromiel al 5 % v/v	81
10. Conclusiones	84
11. Perspectivas	84
12. Referencias bibliográficas	85

Lista de Abreviaturas y Definiciones

App: Aplicación

NMP: Número más probable

MIT App Inventor®: Create apps. Massachusetts Institute of Technology

®: Registered trademark symbol

ISO: Organización Internacional de Normalización

A: Absorbencia

DO: Densidad óptica

T: Transmitancia

ϵ : Coeficiente de extinción molar

l = Longitud de la celda

Lux: Unidad de iluminación sobre área (1 lx = 1 lm/m²)

Pi: piruvato

ADP: Adenosin difosfato

ATP: Adenosin trifosfato

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NAD⁺: especie reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido

$-\log_{(10)}$: logaritmo negativo base diez

ALS: Ambient light sensor

U.R.: Unidades relativas

% m/v: porcentaje masa/volumen

% v/v: porcentaje volumen/volumen

$\frac{3}{8}$ " : tres octavos de pulgada

cm: centímetros

nm: nanómetros

h: horas

mol: magnitud de la cantidad de sustancia

L: litros

mL: mililitros

g: gramos

min: minutos

°C: grados Celsius

E.E.: Error estándar de la media

Fase Lag: Fase de adaptación

Fase Log: Fase logarítmica

iOS®: iPhone® Operating System

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

Índice de ecuaciones, tablas y figuras

Ecuación 1. Ley Lambert Beer	13
Ecuación 2. Densidad óptica	14
Figura 1. Esquema general de un sistema para la medición de la turbidez	16
Ecuación 3. Reacción química de la fermentación alcohólica	18
Figura 2. Esquema general de la fermentación alcohólica	19
Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 4. A) Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> . B) Ascosporas de <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 5. App móvil “Sensor de luz” en MIT App Inventor®	25
Figura 6. Primer módulo de bloques “illuminance”	26
Figura 7. Segundo módulo de bloques. Control de impresión en pantalla	27
Figura 8. Tercer módulo de bloques. Definición de las variables para diseño de la gráfica	28
Figura 9. Cuarto módulo de bloques. Graficar la transmitancia de la luz (lux) vs tiempo (h)	30
Figura 10. Programación completa de la app “Sensor de Luz” en MIT App Inventor®	31
Figura 11. Diseño del prototipo de interfase de medición en cartón	33
Figura 12. Diseño de la interfase de medición final en madera	34
Figura 13. Metodología para realizar caldo papa sacarosa al 1 % m/v	36
Figura 14. Metodología para realizar hidromiel al 5 % v/v	37
Figura 15. Interfase gráfica de la app ”Sensor de luz” desarrollada en MIT App Inventor®	39
Figura 16. Blanco y medio de cultivo con levadura	41
Tabla 1. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas piloto	43
Figura 17. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas piloto	44
Tabla 2. Crecimiento <i>S. cerevisiae</i> en hidromiel al 5 % v/v. Pruebas piloto	45

Figura 18. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en hidromiel al 5 % v/v. Pruebas piloto	46
Tabla 3. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas finales	48
Figura 19. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas finales	48
Tabla 4. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en hidromiel 5 % v/v. Pruebas finales	50
Figura 20. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en hidromiel al 5 % v/v. Pruebas finales	50
Figura 21. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo papa dextrosa al 1 % m/v (literatura)	80
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en hidromiel al 5 % v/v con 20 % m/v extra de glucosa + fructosa (literatura)	82

Resumen

El presente trabajo de tesis realizado en casa tuvo como objetivo el desarrollar una aplicación móvil (Sensor de Luz) para el Smartphone Motorola Moto E5[®], con ayuda de la plataforma MIT App Inventor[®]. La aplicación desarrollada se acopló a un dispositivo láser para medir cambios en la turbidez de un medio de cultivo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando el sensor de luz del teléfono. Los datos obtenidos fueron transformados a unidades de densidad óptica relativa y de esta manera se caracterizó el crecimiento de la levadura en diferentes medios de cultivo. Los resultados obtenidos confirmaron que fue posible determinar la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* con un comportamiento similar al reportado en la literatura, pero obtenido con equipo profesional. La aplicación y el dispositivo desarrollados tienen el potencial de ser utilizados en prácticas de campo y podrían sustituir a un turbidímetro convencional de laboratorio o un turbidímetro portátil del actual mercado, con la ventaja de ser menos costoso y más práctico.

1. Antecedentes

1.1 Métodos de cuantificación de microorganismos

En la actualidad existen diversos métodos para la estimación del crecimiento de los microorganismos, los cuales se basan en el conteo del número de células (métodos directos) o en el análisis de la interacción de la radiación electromagnética con cultivos celulares, así como el análisis de la actividad metabólica y/o la biomasa de la muestra (métodos indirectos), con la finalidad de determinar el número de microorganismos en una muestra (Vierna, *et.al.*, 2015).

De igual forma existen métodos para el conteo de microorganismos viables, los cuales se fundamentan en determinar la presencia de microorganismos vivos. Ejemplos: cuenta en placa y número más probable (NMP). Por otro lado, existen métodos para el conteo de microorganismos totales, los cuales carecen de la capacidad para distinguir entre microorganismos vivos y muertos. Por ejemplo: recuento microscópico, turbidimetría y nefelometría (Vierna, *et.al.*, 2015).

1.2 Turbidez y turbidimetría

La turbidez se define por la Organización Internacional de Normalización (ISO), como la “reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de un material distinto al propio líquido” (ISO 7027-1, 2016). Al ser un indicador de apariencia óptica, ocasionado por la dispersión y absorción de la energía lumínica a través del líquido, la turbidez sólo puede ser medida usando técnicas ópticas. La turbidez se fundamenta en la relación de la intensidad

de la luz incidente y de la luz dispersada por el medio, mediante la ley de Lambert-Beer, la cual nos dice que la absorción de luz a través de una sustancia es proporcional a la concentración de partículas de la misma (**Ecuación 1**) (Acebo, *et.al.*, 2013).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Ecuación 1. Ley de Lambert Beer (Acebo, *et.al.*, 2013).

Donde:

A=Absorbencia (U.R.)

ε := Coeficiente de extinción molar (L/mol*cm)

l = longitud de la celda (cm)

c= concentración de partículas (mol/L)

La turbidez se mide utilizando técnicas de turbidimetría y nefelometría. En esta última se cuantifica la intensidad de la luz dispersada por la muestra bajo análisis y el sensor se encuentra montado en un ángulo de 90° del rayo de luz incidente. Por otro lado, en la turbidimetría se mide la absorbencia de la muestra en estudio. La técnica es comúnmente utilizada para medir el crecimiento de microorganismos en un medio líquido, los cuales bloquean y reflejan la luz que atraviesa el medio (Acebo, *et.al.*, 2013). Una ventaja considerable de esta técnica es que, al ser aplicada en microbiología predictiva, permite una estimación rápida y relativamente sencilla del crecimiento microbiano. La gran desventaja de esta técnica como estimación del crecimiento microbiano, es que no permite discernir entre células viables o muertas, porque desde el punto de vista de la física, una

célula viva o muerta, sigue siendo una partícula en el medio que impide el paso de la luz, aunado a esto, todas esas partículas absorben a la misma longitud de onda (Vidal, *et.al.*, 2014).

1.3 Absorbencia, transmitancia y densidad óptica

La absorbencia es una medida que cuantifica la radiación que absorbe una sustancia a una determinada longitud de onda. Por otro lado, la transmitancia se define como la proporción de luz transmitida que atraviesa una sustancia con respecto a la luz que incide en ella (Vidal, *et.al.*, 2014). A su vez, la densidad óptica es la absorbencia por unidad de longitud (cm) que recorre la luz al atravesar la sustancia (Vidal, *et.al.*, 2014).

Una expresión que nos resultará útil para el propósito del presente proyecto es la Ecuación 2, la cual indica que la densidad óptica de la muestra es el logaritmo inverso de la transmitancia (Vidal, *et.al.*, 2014).

$$DO = -\log_{10} (T)$$

Ecuación 2. Densidad óptica (Vidal, *et.al.*, 2014).

Donde:

D.O. = Densidad óptica (U.R.)

T= Transmitancia (lux)

1.4 Funcionamiento de un turbidímetro

El haz de luz atraviesa el fluido de la muestra, entonces, los sólidos suspendidos dispersan la luz en todas direcciones. La reducción de la intensidad del haz de luz se debe a la difusión del haz por dichos sólidos suspendidos en el medio. Sin embargo, la absorción de la radiación incidente por sustancias coloreadas disueltas también reduce la intensidad de la luz y debe tenerse en cuenta para contrarrestar este efecto, de forma manual o automática (Acebo, *et.al.*, 2013).

En el análisis de bajas cantidades de sólidos suspendidos se suele usar la medida de la luz dispersa, debido a que los fotodetectores detectan pequeños cambios en la intensidad de la luz en contraste con un fondo oscuro. Sin embargo, este método tiene como desventaja que con grandes cantidades de sólidos disueltos en la muestra se produce una dispersión múltiple que limita la cantidad de luz que recibe el detector. Por lo tanto, se recomienda que a elevadas concentraciones de sólidos suspendidos se utilicen métodos de medición alternativos, tales como los de absorción (Vidal, *et.al.*, 2014).

Generalmente, un sistema para la medición de turbidez consta de una fuente de luz, un depósito para la muestra en análisis y un fotodetector (fotodiodo, fotorresistencia). La fuente de emisión de luz (LED o láser) tiene la capacidad de emitir a una longitud de onda determinada. Existe un recipiente cristalino o frasco donde se coloca la muestra en estudio y el fotodetector se comporta como receptor de los fotones o sensor óptico. Dicho fotodetector se encuentra antes de

un bloque de acondicionamiento, que permite amplificar y filtrar las señales emitidas por él en forma de impulsos eléctricos. Estas señales pueden ser introducidas en una Unidad Central de Procesamiento y Control (UCPC) encargada de la conversión analógica-digital de la señal de entrada, así como la cuantificación y el procesamiento matemático con el objetivo de proporcionar el resultado requerido. Esto permite mostrar el valor de la turbidez medida después del procesamiento digital (Sandrea, *et.al.*, 2006).

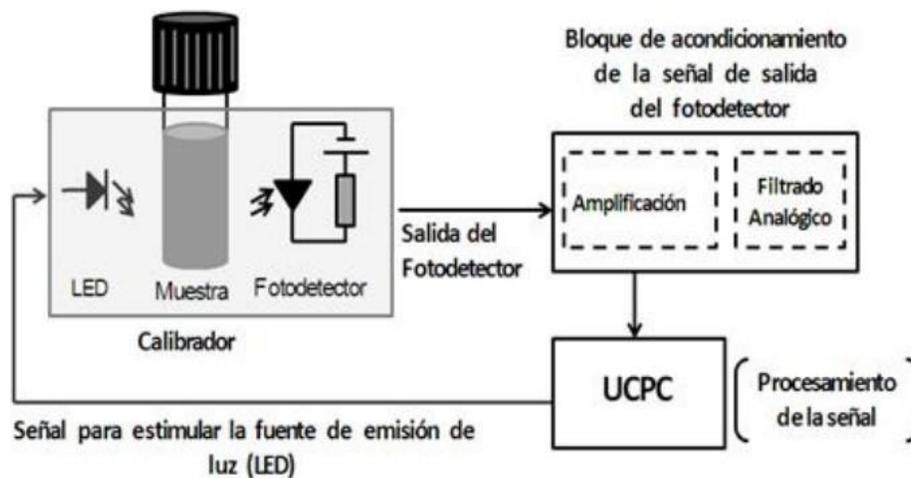


Figura 1. Esquema general de un sistema para la medición de la turbidez. Se compone de una fuente de luz, muestra y fotodetector. Asimismo consiste de un bloque de acondicionamiento de la señal y una Unidad Central de Procesamiento y Control (UCPC) (Acebo, *et.al.*, 2013).

1.5 Ventajas y desventajas de los turbidímetros

A continuación, se enumeran algunas ventajas y desventajas en la utilización de equipos de turbidimetría para la estimación del crecimiento microbiano:

- Estimación rápida del crecimiento de microorganismos (Acebo, *et.al.*, 2013).

- Gran aplicabilidad (análisis de agua, estimación de crecimiento microbiano, análisis de fibrinógeno, triglicéridos, etc.) (Vidal, *et.al.*, 2014).
- Portátiles (existen modelos portátiles de venta en internet) (HACH, 2021).
- No invasivos (no provocan lisis celular) (HACH, 2021).
- Permiten reutilizar la muestra (Vidal, *et.al.*, 2014).

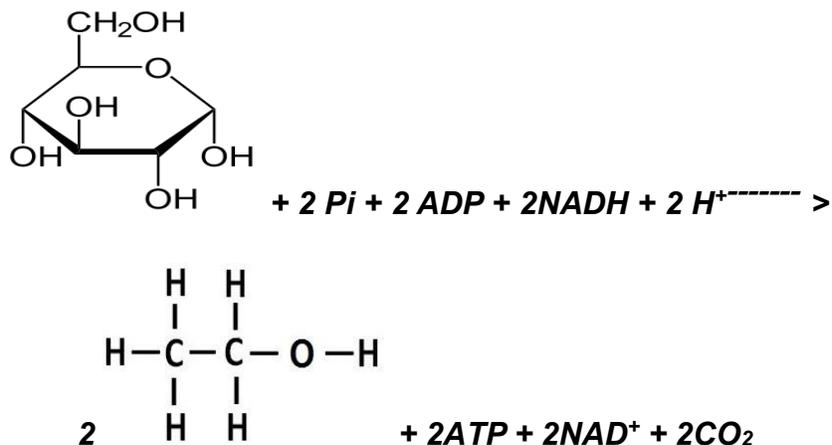
Desventajas

- Costo elevado (\$8,000 – \$40,000 MXN) (HACH, 2021).
- Elevada concentración celular (ya que, al existir una gran cantidad de sólidos suspendidos, se produce una dispersión múltiple de la luz, lo que limita la cantidad de luz que logra atravesar la muestra y es captada por el detector) (Acebo, *et.al.*, 2013).
- Densidad óptica no es indicador directo de la viabilidad celular (las células viables como las no viables absorben a una longitud de onda específica) (Acebo, *et.al.*, 2013).

1.6 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo modelo para estudios de crecimiento microbiano

La medición de turbidez se utiliza para estimar el crecimiento de bacterias o levaduras como una alternativa rápida a otras técnicas convencionales. Dentro de los procesos biotecnológicos donde se monitorean cambios en la turbidez asociados al crecimiento de microorganismos se encuentra la fermentación alcohólica (Acebo, *et.al.*, 2013).

La levadura del pan *S. cerevisiae* es un ejemplo de microorganismo capaz de crecer en medios respiratorios o fermentativos (anaerobio facultativo). Durante la fermentación, la única vía de generación de ATP es la glucólisis, con dos reacciones adicionales a la producción de piruvato. Por lo anterior, la fermentación alcohólica en *S. cerevisiae* es una vía metabólica que permite degradar azúcares transformándolos en etanol y dióxido de carbono (Labuschagne, *et.al.*, 2021).



Ecuación 3. Reacción química de la fermentación alcohólica. Adaptación de la reacción propuesta por Avissar y colegas. Esta expresión nos muestra que a partir de una molécula de glucosa obtendremos dos moléculas de etanol y dos moléculas de CO₂ (Avissar, *et.al.*, 2013).

La **Ecuación 3** resume la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono (Avissar, *et.al.*, 2013). Es gracias a este proceso finamente regulado que la levadura puede llevar a cabo sus múltiples procesos metabólicos, entre los que destacan, el reproducirse y biotransformar diversos compuestos que le otorgan un sabor típico

a los derivados etílicos obtenidos en el proceso de fermentación (Labuschagne, *et.al.*, 2021).

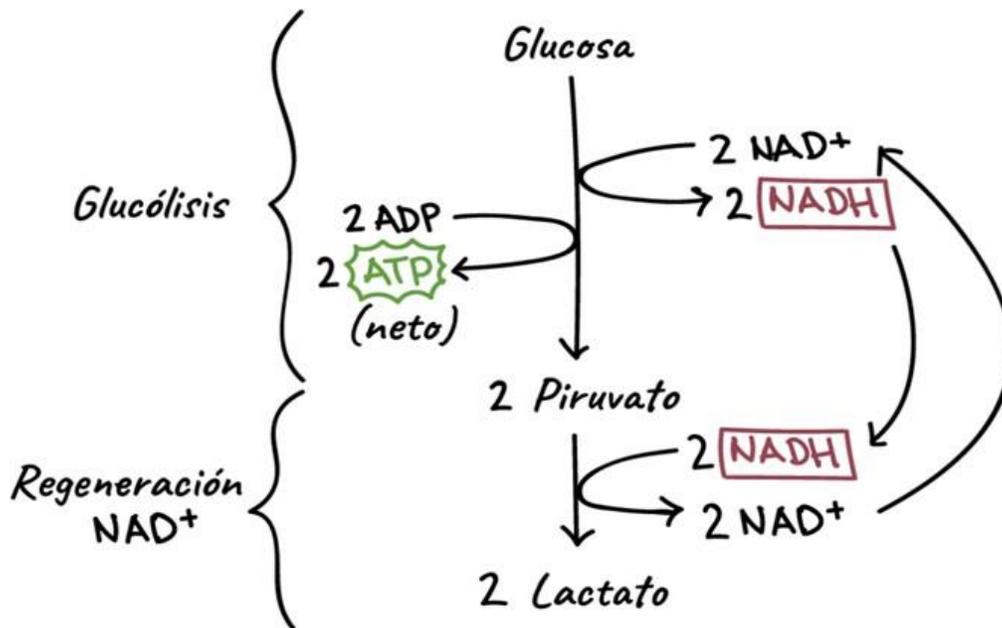


Figura 2. Esquema general de la fermentación alcohólica. Se muestra a la glucólisis de forma general, donde a partir de una molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de piruvato, y posteriormente estas últimas se transforman en dos moléculas de etanol (Avisar, *et.al.*, 2013).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que presenta células alargadas, globosas o elipsoidales. En medios sólidos, la apariencia de sus colonias es muy diversa: principalmente son de color crema o ligeramente cafés, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas y brillantes u opacas (Bonifaz, *et.al.*, 2012).

Saccharomyces cerevisiae es un organismo modelo debido a su inocuidad, facilidad de manejo y cultivo, además de que se conoce con precisión su genoma

completo. Los productos etílicos consumibles a partir de este proceso son: cerveza, vino y otros (Sánchez, 2011).

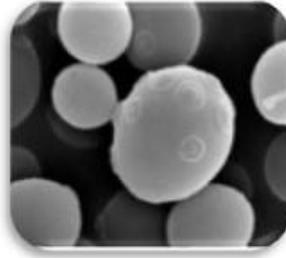


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de *S. cerevisiae* (Sánchez, 2011).



Figura 4. A) Cultivo de *S. cerevisiae*. B) Ascosporas de *S. cerevisiae* (Bonifaz, *et.al.*, 2012).

En forma general se pueden presentar dos fenómenos con respecto a esta levadura: la producción de etanol, para la elaboración de cerveza y vino; o bien, la formación del anhídrido carbónico (CO_2), durante la fabricación del pan, sin olvidar que también este microorganismo es utilizado para la producción de probióticos.

Para el propósito del presente trabajo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue obtenida mediante sobres de levadura comercial de la marca TRADI-PAN®. TRADI-PAN® es una levadura seca instantánea seleccionada de *Saccharomyces*

cerevisiae elaborada bajo los más estrictos procedimientos de control de calidad, asegurando así una calidad constante y una conservación de su alto poder fermentativo. Se trata de pequeños cilindros color beige con una superficie porosa, los cuales son agregados deshidratados de esta levadura. El producto se debe conservar en un lugar fresco y seco (TRADI-PAN®, 2008).

2. Planteamiento del Problema

Los turbidímetros comerciales son dispositivos cuyo precio ronda entre los \$15,000 y \$40,000 MXN (HACH, 2021). Por otro lado, son dispositivos que típicamente no ofrecen portabilidad para estudios de campo. El precio de los turbidímetros portátiles ronda entre los \$8,000 y \$20,000 MXN (HACH, 2021), y pese a ser un dispositivo fácil de transportar a las prácticas de campo, sigue siendo un equipo de precio relativamente elevado. Aunado a esto, son equipos de disponibilidad relativamente restringida, ya que, en la mayoría de las ocasiones, sólo los laboratorios e instituciones los pueden comprar.

En vista de que hoy en día la adquisición de un turbidímetro portátil es relativamente costosa y de cierta forma restringida, en el presente proyecto se detalla una propuesta de solución de bajo costo utilizando un teléfono inteligente como herramienta de medición. Cabe resaltar que en 2020, existieron más de 3.8 mil millones de teléfonos inteligentes activos en el mundo. Las marcas preferidas fueron Samsung® (Android®) y Apple® (iOS®) con 27 y 24 % de compra respectivamente. Esto quiere decir que la población global tiene un acceso más

viable a dispositivos con sistema operativo Android®, que con respecto a dispositivos con sistema iOS® (Kooistra, 2021). Específicamente en México, según datos del INEGI, 9 de cada 10 habitantes en nuestro país posee un teléfono inteligente. Es decir, 88.2 millones de usuarios poseen un Smartphone, cifras que corresponden al 75.5 % de la población mexicana total. El teléfono inteligente suele ser el dispositivo electrónico preferido por el mexicano (INEGI, 2021).

Por esta razón, una meta del presente trabajo fue desarrollar una aplicación móvil (Sensor de Luz) para el Smartphone Motorola Moto E5®, con ayuda de la plataforma MIT App Inventor®. La aplicación desarrollada fue acoplada a un dispositivo para medir la fermentación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Todo esto nos permitió obtener datos de transmitancia (lux) vs tiempo (h) utilizando el sensor de luz del teléfono, los cuales se transformaron a unidades de densidad óptica relativa, es decir, unidades relativas (U.R.). De esta manera fue posible monitorear la cinética de crecimiento de la levadura en diferentes medios de cultivo caseros (caldo papa-sacarosa 1 % m/v e hidromiel al 5 % v/v). Cabe aclarar que el presente proyecto fue realizado totalmente en casa debido al confinamiento impuesto por la pandemia de Covid-19.

3. Hipótesis

- A mayor crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un cultivo, habrá una menor señal de transmitancia detectada por el sensor de luz de un teléfono inteligente.

4. Objetivo general

- Desarrollar una App móvil para el sistema operativo Android®, acoplada a un dispositivo para medir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

5. Objetivos particulares

- Diseñar una App móvil “Sensor de Luz” en MIT App Inventor® para el sistema operativo Android®.
- Diseñar un dispositivo externo acoplado al sensor de luz del Smartphone para medir el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Acoplar la App móvil (sensor de luz) con el dispositivo para medir la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Desarrollar medios de cultivo en casa (Caldo papa sacarosa 1% m/v e hidromiel 5 % v/v) para medir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Realizar pruebas “piloto” para conocer la velocidad de crecimiento y definir los tiempos de muestreo idóneos del microorganismo en los medios de cultivo correspondientes.
- Obtener datos de transmitancia (lux) vs tiempo (h) y transformarlos en datos de D.O. relativa (U.R.), con su respectivo manejo algebraico y gráfico para conocer la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Monitorear el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en los diferentes medios de cultivo.

6. Materiales

- Computadora laptop marca HP® DESKTOP-SBHS1A2 Intel inside (R), Celeron(R), CPU: N3050, @ 1.60GHz
- Smartphone Motorola Moto E5®
- Balanza digital para cocina marca QMOSHEN®
- Taza medidora marca Yuliana®
- Recipientes medidores para jarabe marca MAVER®
- Estufa marca Mabe®
- Recipiente de vidrio con parafilm
- Papel parafilm
- Garrafón de 20 L de agua marca CIEL®
- Válvula airlock para anaerobiosis marca EHL®
- Láser diodo LD: 680 nm, 4 mW. Marca SHUANG.W®
- Batería para láser tipo reloj LR41H marca T&E® button cell 1.5 V
- Madera triplay, cartón, barniz, pintura negra y clavos
- Taladro y brocas de $\frac{3}{8}$ " marca TRUPER®
- Medio caldo papa sacarosa al 1 % m/v: agua, papa y sacarosa
- Medio hidromiel al 5 % v/v: agua y miel
- Utensilios de cocina (ollas de acero inoxidable, cucharas, pocillo de peltre)
- Tubos de ensayo 13x100 mm de 10 mL marca PYREX®

6.1 Material Biológico

- Levadura instantánea TRADI-PAN® (*Saccharomyces cerevisiae*)

7. Metodología y procedimiento experimental

7.1 App móvil “sensor de luz”

El diseño de la App se llevó a cabo utilizando un sistema de programación en bloques dentro de la plataforma MIT App Inventor®. Esto permitió registrar los cambios en el sensor de luz de transmitancia (lux) vs tiempo (h) (**Figura 5**).

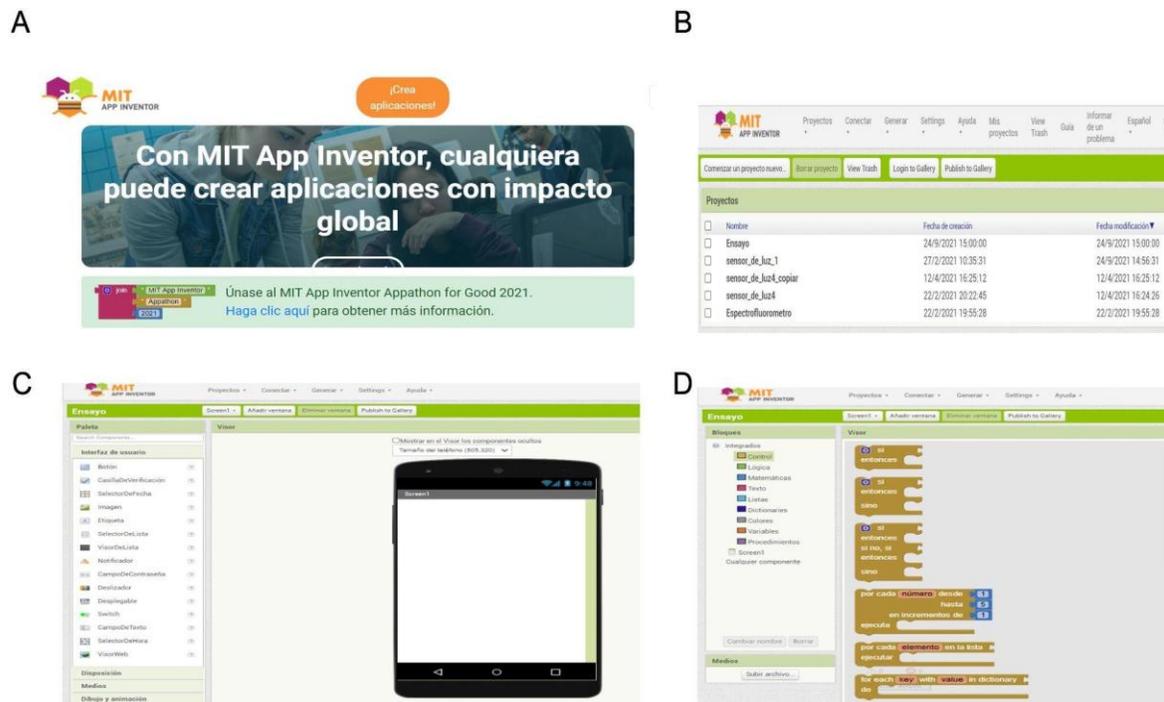


Figura 5. App móvil “Sensor de luz” en MIT App Inventor®. A) Página principal de MIT App Inventor® para crear nuevas apps, B) Registro gratuito y página de inicio para empezar nuevos proyectos, C) Proyecto nuevo: vista de diseño en el teléfono, D) Proyecto nuevo: vista de diseño de bloques (MIT App Inventor®, 2021).

7.2 Programación de la App

La aplicación hace uso de un ambiente gráfico que utiliza herramientas de código preestablecidas denominadas “bloques”. Cada bloque lleva a cabo una función

específica para la app móvil. Adicionalmente, esta plataforma cuenta con un emulador que permite probar la funcionalidad del código de bloques en nuestro dispositivo Android® sin necesidad de descargar la app completa.

Inicialmente se estableció el control parental de la app (color café) que permitió controlar al sensor de luz en su totalidad. Se implementaron diferentes bloques para medir la luz detectada por el sensor de luz ambiental, también conocido como Ambient Light Sensor (ALS). Por ejemplo, el bloque para captar la señal de luz e interpretarla (color verde oscuro), el bloque para establecer las condiciones numéricas de la variable X y Y (color azul), es decir, 3 decimales después del punto para la variable Y y el bloque para definir el nombre de las variables X (tiempo) vs Y (transmitancia), cuyo color de los bloques es anaranjado. Este módulo de bloques en conjunto funciona con el esquema lógico “if” (supuesto) vs “then” (respuesta) **(Figura 6).**



Figura 6. Primer módulo de bloques “illuminance”. Este bloque permite el control del ALS (Ambient Light Sensor) del dispositivo móvil para que pueda captar una señal de luz e interpretarla como transmitancia de la luz a través de la muestra (lux) vs tiempo (h).

Aunado a esto, se insertó un control adicional de impresión en pantalla. Esto permitió visualizar los resultados en la pantalla del teléfono inteligente **(Figura 7).** Este segundo módulo de bloques consiste de un bloque de control de impresión

de pantalla (color café), así como de un bloque de lógica (color verde claro), de tal forma que, si no existe una señal de luz captada por el sensor, no existirá una lectura en la pantalla del dispositivo. El bloque verde azulado permite la operación del sensor de luz del Smartphone. El bloque morado realiza procedimientos, en este caso, detecta la señal de luz mediante el sensor y la interpreta como una respuesta en la pantalla del Smartphone. El bloque rosa funciona para mostrar las unidades de las variables en la pantalla. **(Figura 7).**

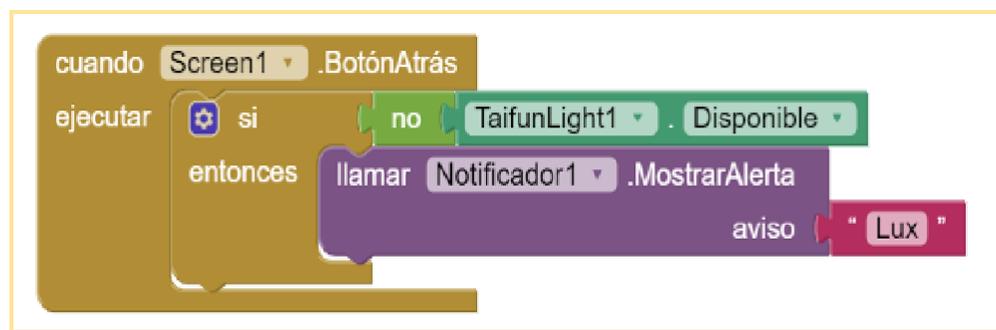


Figura 7. Segundo módulo de bloques. Control de impresión en pantalla. Este módulo de bloques permite visualizar los resultados de las mediciones en la pantalla del móvil.

El tercer módulo tiene la finalidad de definir las variables del experimento con ayuda de los bloques de color anaranjado. Estos se activarán siempre y cuando el valor de la señal sea mayor o igual a cero **(Figura 8).**

En dichos bloques anaranjados se muestran cuatro variables globales: X, Y, "X anterior" y una variable "Y anterior", dándoles un valor de cero a las variables "X y Y anteriores" respectivamente, para que se inicie en dichos puntos la toma de resultados y por ende las gráficas correspondientes inicien en el origen. Entonces, para que los valores en la gráfica del eje X y del eje Y pudieran avanzar, y así obtener resultados, se le sumó 0.001 unidades a la variable Y, y en cuanto a la

variable X (tiempo), se tomaba una medición a cada segundo. La resolución de la transmitancia en nuestro dispositivo fue de 0.001 unidades lux (**Figura 8**). De esta manera se creó un algoritmo que permite graficar las mediciones de transmitancia de la luz (lux) con respecto al tiempo (h).



Figura 8. Tercer módulo de bloques. Definición de las variables para diseño de la gráfica. El eje Y representa la transmitancia de la luz a través de la muestra (lux), mientras que el eje X representa el tiempo (h). Las variables “X y Y anteriores” representan el cero para ambas variables.

Después de obtener los valores visibles de transmitancia de la luz (lux) en la pantalla del celular vs tiempo (h), se decidió adicionar un módulo de bloques que permitieran graficar el conjunto de datos de transmitancia de la luz (lux) con respecto al tiempo (h). Este tipo de captura de datos es útil para visualizar el comportamiento de la transmitancia de la luz durante el transcurso del tiempo.

El cuarto y último módulo se compone de dos conjuntos de bloques; el primero de ellos consiste en los códigos que permiten controlar la señal de luz en el sensor para interpretarla y generar una respuesta, tomando como punto de partida “X anterior” = 0 y “Y anterior” = 0, teniendo en cuenta que a las mediciones de

transmitancia de la luz (lux) que fueron mayores o iguales a cero, se les sumaron 0.01 unidades para registrar los resultados y fueron graficados con respecto al tiempo. Esto quiere decir que nuestros resultados de transmitancia tuvieron tres decimales. En cuanto a la variable X que representa el tiempo, se le sumaron 0.1 unidades. Cabe resaltar que 0.1 unidades en MIT App Inventor® hablando del tiempo, se refieren a la toma de resultados por segundo. Por lo tanto, a cada segundo se registraba un cierto valor de transmitancia para no perder información si existía algún problema durante la toma de la medición, pese a que se definieron los tiempos de muestreo en magnitud de horas. Aunado a esto, el color de la gráfica fue rojo y el tiempo de actualización fue del orden de segundos (**Figura 9**).

Este primer conjunto de bloques consiste del control parental en color café seguido de un bloque verde oscuro superior que capta e interpreta la señal de luz, así como un bloque azul con la indicación de captura de mediciones, siempre y cuando estas sean mayores o iguales a cero. En color anaranjado se encuentran los bloques correspondientes a las variables “X y Y anteriores”, así como X y Y. Los bloques verdes oscuros inferiores permiten dibujar el gráfico (**Figura 9**).

El segundo conjunto de códigos consiste de un accesorio de procedimientos nombrado “lienzo 1” (bloque morado), este bloque se utilizó para definir los ejes de la gráfica e imprimirlos en pantalla, de igual forma se colocaron las variables del experimento. El punto de partida fue $X_1 = \text{“X anterior”} = 0$, $Y_1 = \text{“Y anterior”} = 0$, el siguiente punto fue el de las variables X y Y, recordando que X es igual a la variable “X anterior” más 1 segundo y la variable Y es igual a la variable “Y anterior” más 0.001 unidades lux. Asimismo, los bloques de color verde oscuro

funcionaron para definir el alto y ancho de las variables en centímetros. También se adicionó un nuevo bloque morado que funciona como condicional, donde si nuestro valor de la variable X es mayor o igual al ancho de la pantalla de nuestro celular, se dará la orden de limpiar la pantalla de la gráfica automáticamente y volver a graficar desde el inicio de la zona destinada para tal fin (**Figura 9**).

Esta segunda parte consiste de un bloque morado cuya función es mostrar en pantalla la gráfica considerando que $X_1 = \text{“X anterior”} = 0$ y $Y_1 = \text{“Y anterior”} = 0$, mientras que X_2 y Y_2 sean las mediciones que se vayan registrando (X y Y). Los bloques verdes azulados con la leyenda “Lienzo 1” permiten definir los ejes de la gráfica. El bloque morado con la leyenda “limpiar” permite depurar la pantalla siempre y cuando la variable X sea mayor o igual al ancho de la misma (**Figura 9**).

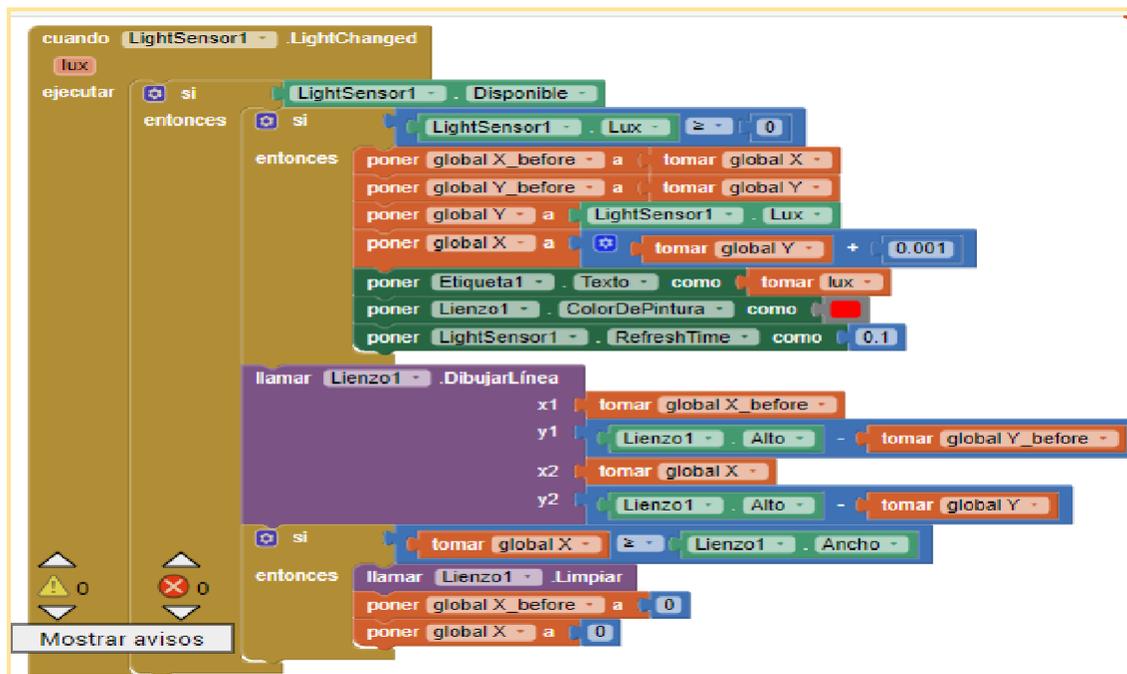


Figura 9. Cuarto módulo de bloques. Graficar la transmitancia de la luz (lux) vs tiempo (h).

Se compone de dos conjuntos de bloques; el primero de ellos consiste en los códigos que permiten

controlar la señal de luz en el sensor para interpretarla y generar una respuesta y el segundo funciona para definir las condiciones numéricas de las variables y las dimensiones de la gráfica para que se obtenga en tiempo real.

El diseño completo de la app se muestra a continuación (**Figura 10**).

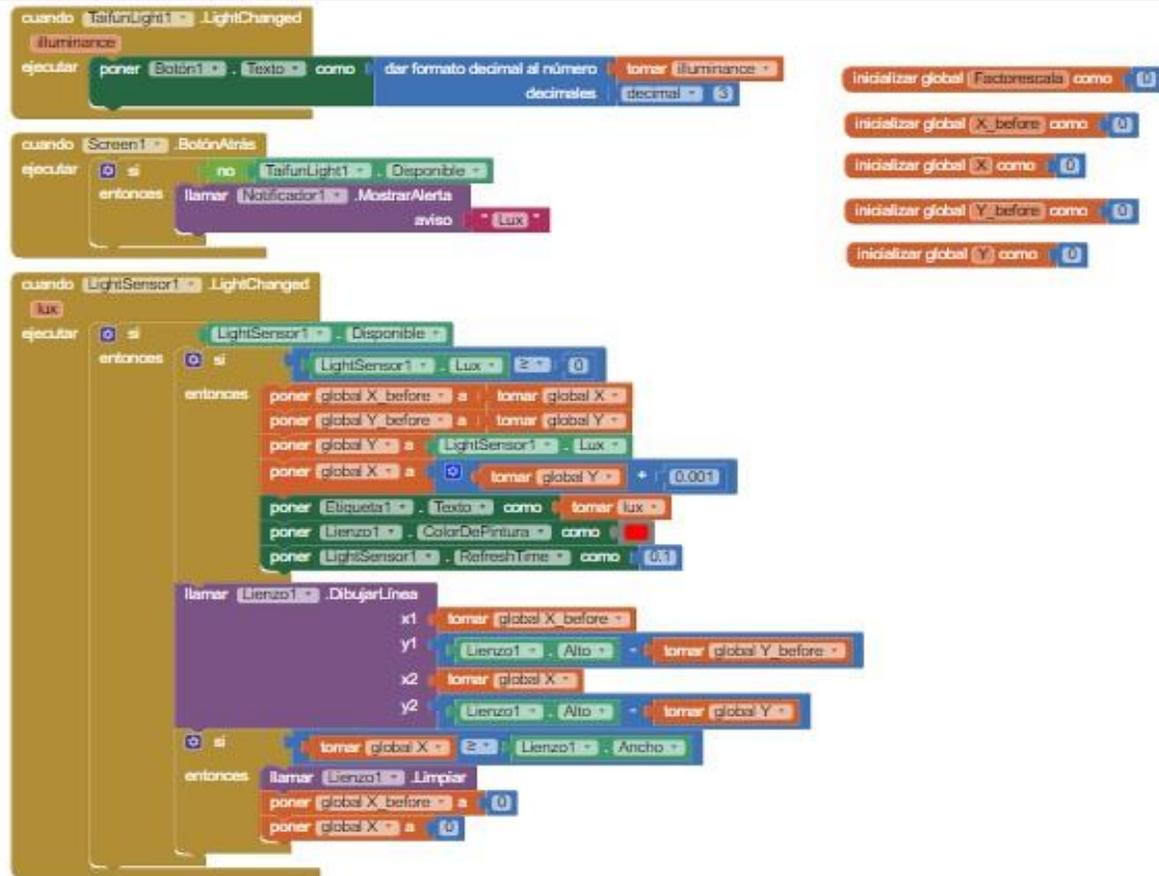


Figura 10. Programación completa de la app “Sensor de Luz” en MIT App Inventor®. Esta app permite detectar por medio del ALS (Ambient Light Sensor), la transmitancia de la luz a través de la muestra (lux) vs el tiempo (h) así como su respectiva gráfica en tiempo real.

Una vez terminada la programación en bloques de la app móvil (**Figura 10**) se cargó el software en el teléfono inteligente a través de la generación de un archivo con terminación .apk y gracias a una aplicación gratuita obtenida de la App Store® de Android®, se realizó la instalación adecuada de la misma en el Smartphone.

7.3 Diseño de la interfase de medición

Inicialmente se construyó un dispositivo para albergar la muestra en un ambiente sin interferencia de luz externa. El prototipo estaba diseñado con una caja de cartón que funcionaba de soporte para la fuente de luz (láser de luz roja que se emite a 680 nm), y una segunda caja de cartón con un soporte de plástico donde se colocaba el tubo de ensayo que contenía a la muestra, así como un par de perforaciones al costado de dicha caja para permitir el paso de luz del láser por un lado y del otro lado poder colocar el sensor de luz del Smartphone Motorola Moto E5® (**Figura 11**). Dicho prototipo tenía diversos problemas ya que los orificios del cartón no impedían del todo la interferencia de luz exterior, porque no tomaban en cuenta el tamaño del diámetro del láser, también al ser un material de poca resistencia perdía su estructura con el uso, modificando así la posición del tubo de ensayo que contenía a la muestra y con esto el ángulo del paso de luz, alterando nuestros resultados. Finalmente, se optó por escalar el prototipo usando un diseño a base de madera para corregir estos errores.



Figura 11. Diseño del prototipo de interfase de medición en cartón. El dispositivo consiste de dos cajas de cartón de color negro, un láser que emitió luz roja a 680 nm, el tubo de ensayo con la muestra y la app "sensor de luz" instalada en el Smarphone Motorola Moto E5®.

Este prototipo se perfeccionó utilizando bloques de madera triplay. Este último diseño resultó mejor en términos de durabilidad y resistencia. Ambas estructuras de madera (la horizontal de soporte para el láser y la estructura vertical donde se colocaba la muestra) consistían de seis bloques de madera con las siguientes características:

- 2 bloques de madera triplay de 11.5 cm largo x 5.5 cm ancho x 1.5 cm profundidad (laterales).
- 2 bloques de madera triplay de 11.5 cm largo x 3.0 cm de ancho x 1.5 cm de profundidad (laterales).
- 2 bloques de madera triplay de 6 cm largo x 5.5 cm ancho x 1.5 cm profundidad (tapas inferior y superior).

El dispositivo final consistió de dos estructuras de madera triplay barnizadas, una de ellas se utilizó como soporte para el láser que emitió luz roja a 680 nm

(posición horizontal) y la otra funcionó para contener el tubo de ensayo con la muestra y evitar la interferencia de luz ambiental (posición vertical). Esta última estructura tenía dos perforaciones realizadas con taladro y broca de tres puntas para madera marca TRUPER® de 3/8", una de ellas destinada para el paso de luz roja mediante el láser y la otra para colocar el sensor de luz del Smartphone con la app y así registrar las mediciones de transmitancia de la luz a través de la muestra (lux) vs tiempo (h). Asimismo esta estructura en posición vertical tenía la tapa superior removible para colocar el tubo de ensayo con la muestra en su interior, cuyo soporte era una tapa de plástico de 1 cm de diámetro. En ambas estructuras, los bloques de madera se unieron mediante clavos pequeños para mayor durabilidad y resistencia del dispositivo final (**Figura 12**).

A



B



C



D



Figura 12. Diseño de la interfase de medición final en madera. Se muestra a la interfase de medición final realizada con madera triplay barnizada captada desde diferentes ángulos: A) vista frontal, B) vista posterior, C) vista superior, D) vista de funcionamiento del dispositivo final.

7.4 Preparación de medios de cultivo

7.4.1 Preparación de caldo papa sacarosa al 1 % m/v

Se fijó un volumen inicial de agua (500 mL) y se determinaron por ensayo y error las cantidades requeridas de papa (3 g), sacarosa al 1 % (5 g) y levadura (1 g). Posteriormente, se colocaron en ebullición los 3 g de papa en 500 mL de agua durante 5 minutos. Una vez tibio, se colocó en una taza medidora. Se completó el volumen inicial. Después, se añadieron 5 g de sacarosa a la infusión anterior y se mezcló adecuadamente. Luego, se añadió 1 g de levadura comercial TRADI-PAN® al medio anterior y se mezcló bien. Se conservó la mezcla en un recipiente de vidrio con papel parafilm a temperatura ambiente y se tomó una alícuota de 3 mL cada tiempo en tubos de ensayo (en zona aséptica), para registrar lecturas de transmitancia (lux) vs tiempo (h) de agua, blanco y muestra (**Figura 13**) (Merck Millipore, 2021).

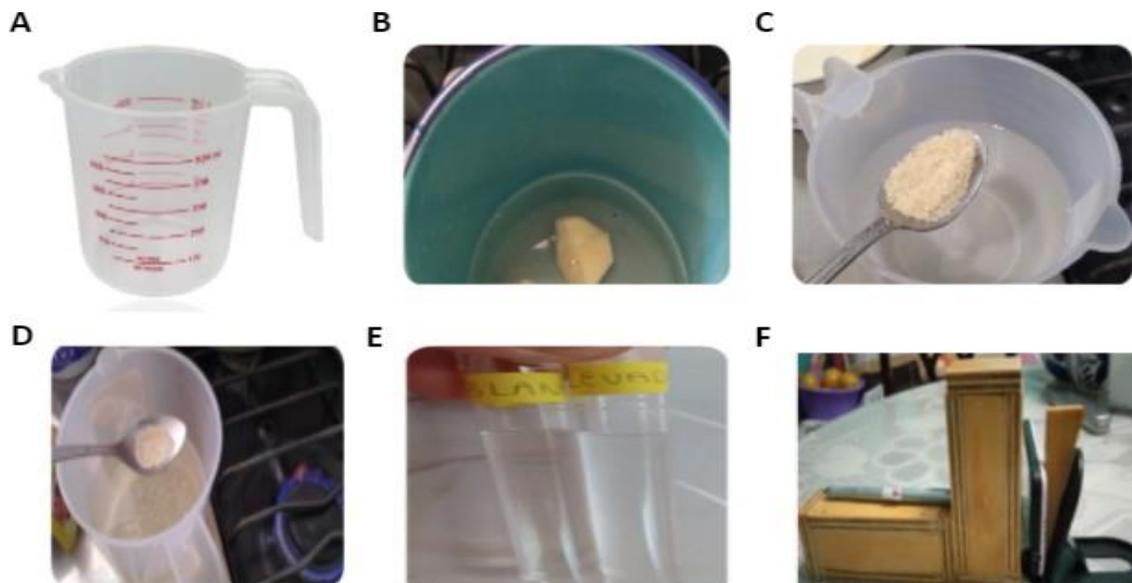


Figura 13. Metodología para realizar caldo papa sacarosa al 1 % m/v. A) Volumen inicial de agua de 500 mL en taza medidora, B) Añadir 3 g papa/500 mL agua durante 5 min en ebullición y se completó el volumen inicial, C) Añadir 5 g sacarosa/500 mL de infusión anterior, D) Añadir 1 g de levadura TRADI-PAN® a la mezcla anterior, E) Blanco y muestra en tubos de ensayo bien etiquetados y cubiertos con parafilm, F) Registro de lecturas de transmitancia (lux) vs tiempo (h) para agua, blanco y muestra.

7.4.2 Preparación de Hidromiel al 5 % v/v

Se calentaron 10 L de agua y cuando alcanzaron una temperatura aproximada de 50 °C se agregaron 500 mL de miel (5 % v/v). La mezcla anterior se mantuvo en ebullición durante 10 minutos. Posteriormente, la mezcla se calentó a 65 °C durante 20 minutos. Después, se enfrió el mosto lo más rápido posible para evitar contaminación y se agregó tibio al fermentador. Luego, se añadió 1 g de levadura comercial TRADI-PAN® y se mezcló. Se cerró el fermentador y se colocó la válvula airlock durante 3 días. Se tomó una alícuota de 3 mL a cada tiempo en tubos de

ensayo (en zona aséptica), para registrar lecturas de transmitancia (lux) vs tiempo (h) del agua, blanco y muestra (**Figura 14**) (Archundia, 2014).

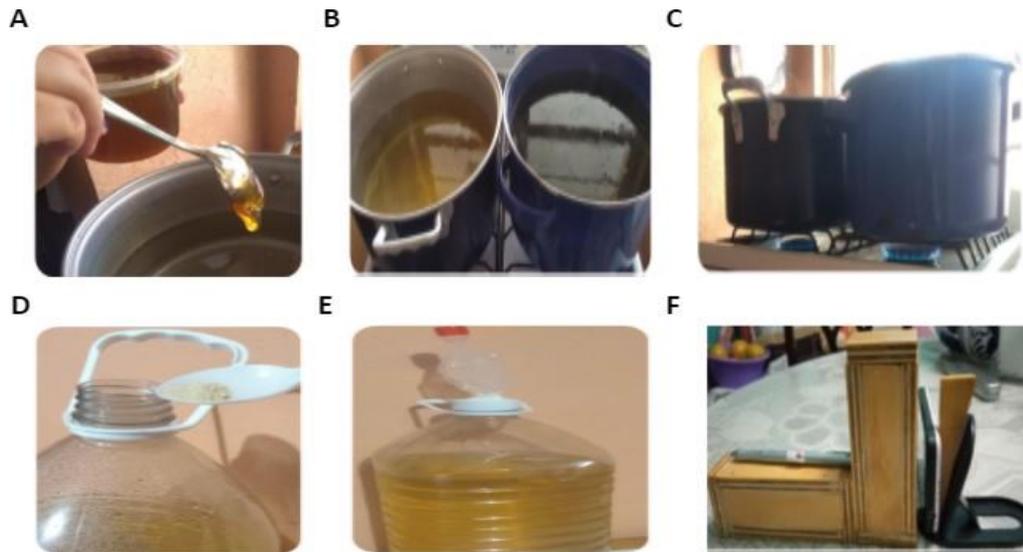


Figura 14. Metodología para realizar hidromiel al 5 % v/v. A) Calentamiento de 10 L de agua a 50 °C para añadir 500 mL de miel, B) Ebullición de la mezcla durante 10 minutos, C) Calentamiento de la mezcla a 65 °C durante 20 minutos, D) Adición de la mezcla tibia al fermentador + 1 g de levadura TRADI-PAN®, E) Colocar válvula airlock al fermentador durante 3 días, F) Registro de lecturas de transmitancia (lux) vs tiempo (h) de agua, blanco y muestra.

8. Resultados

8.1 Interfase gráfica de la App y pruebas de medición

Para comprobar el correcto funcionamiento del dispositivo se llevaron a cabo mediciones de la luz que emite el foco en una habitación, acercándose y alejándose para verificar que el sensor mostrara los diferentes resultados de transmitancia de la luz (lux) vs tiempo (h) y comprobar que nuestra app funcionara adecuadamente (**Figura 15**), así como lecturas basales usando agua potable

obtenida de un purificador Pureit de Unilever® con la cual se prepararon los medios de cultivo, y finalmente mediciones preliminares en los medios de cultivo (caldo papa sacarosa al 1 % m/v e hidromiel al 5 % v/v), solo que estos últimos al ser muy turbios en los primeros intentos daban resultados de cero unidades lux, ya que no era posible que el haz de luz roja del láser (que se emite a 680 nm), atravesara el tubo de ensayo que contenía a los medios de cultivo sobresaturados. Entonces, se corrigieron las proporciones de los ingredientes para obtener un medio de cultivo lo más traslúcido posible y que no afectara los resultados. Cabe resaltar que nuestro sensor de luz tiene la capacidad de registrar el cero de transmitancia de luz. Es decir, cuando existe un objeto que bloquea todo el pasode la luz hacia el sensor, con una resolución de transmitancia de 0.001 unidades lux. En resumen, la App puede registrar de 0 unidades lux hasta infinito, ya que no existe un límite establecido para esta variable en dicha plataforma.

En la interfase final de la app “Sensor de Luz” se muestra un recuadro de texto de color blanco donde se indica la lectura de la transmitancia de la luz a través de la muestra en unidades lux. Además, se encuentra otro recuadro de texto en color rosa, donde se denota la relación de resultados que obtendremos. Es decir, transmitancia de la luz (lux) vs tiempo (h) en letra negrita. Después se muestra un espacio en blanco donde se graficarán los resultados obtenidos en tiempo real, así como un último recuadro de color rosa cuya función es mostrar el resultado de la transmitancia para hacer más evidente el resultado de la medición (**Figura 15**).

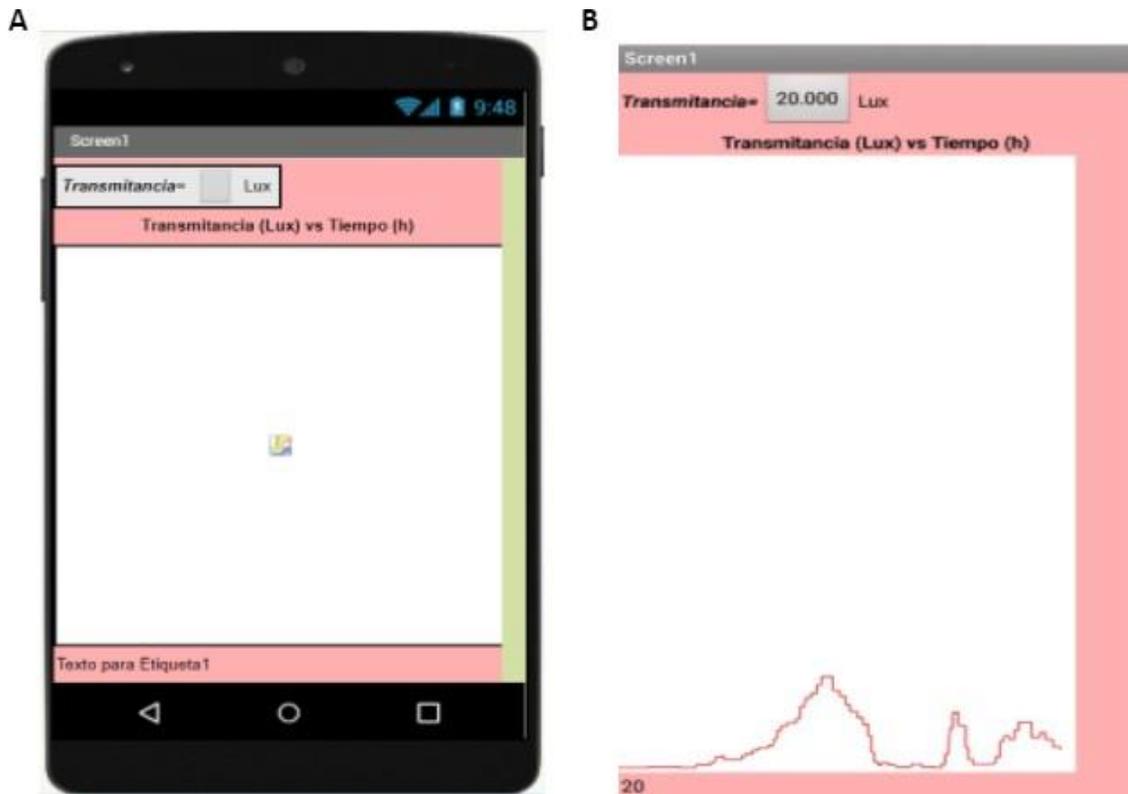


Figura 15. Interfase gráfica de la app "Sensor de luz" desarrollada en MIT App Inventor®. App registrando lecturas de transmitancia de la luz (lux) vs el tiempo (h) cuando se acercaba y alejaba el sensor del móvil al foco de una habitación con su respectiva gráfica en tiempo real. A) Interfase de la app vista mediante un ordenador. B) Interfase de la app vista desde el Motorola Moto E5®.

8.2 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo

Se preparó el medio caldo papa sacarosa al 1 % m/v, llevando a cabo una adaptación del caldo papa dextrosa al 1 % reportado (Merck Millipore, 2021).

Cabe resaltar que en un inicio se usaron 12 g de papa por cada 1000 mL de agua tal como lo indicaba la literatura, pero debido a que el medio era muy turbio e impedía obtener lecturas de transmitancia de la luz (lux) vs tiempo (h), se decidió

hacer una dilución de 1:4 con respecto a la cantidad de papa. Este factor fue encontrado por ensayo y error hasta que tuviéramos el medio de cultivo ideal para obtener resultados de transmitancia de la luz a través de la muestra.

Se reportan las cantidades de los reactivos utilizados y el medio final (**Figura 16**).

$$\text{Agua final} = 500 \text{ mL}$$

$$\text{Papa final} = 3 \text{ g}$$

$$\text{Sacarosa final} \rightarrow 500 \text{ mL} \frac{1 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 5 \text{ g}$$

$$\text{Levadura TRADI - PAN® final} = 1 \text{ g}$$

Debido a que ambos medios presentaban mucha turbidez y con la finalidad de caracterizar el crecimiento de las levaduras a través de las diferentes etapas de su desarrollo, se decidió utilizar 1 g de la misma en ambos medios de cultivo.

En forma adicional se preparó el medio de cultivo Hidromiel al 5 % v/v, llevando a cabo una adaptación del medio utilizado en la elaboración de cerveza artesanal fabricada con miel de abeja mexicana (Archundia, 2014).

Se reportan las cantidades de los reactivos utilizados y el medio final (**Figura 16**).

$$\text{Agua final} = 10 \text{ L} = 10,000 \text{ mL}$$

$$\text{Miel final} \rightarrow 10,000 \text{ mL} \frac{5 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 500 \text{ mL}$$

$$\text{Levadura TRADI - PAN® final} = 1 \text{ g}$$

Se utilizó la parrilla de una estufa para crear zona aséptica. Los medios de cultivo se esterilizaron llevándose a ebullición. El caldo papa sacarosa al 1 % m/v se almacenó en un recipiente de vidrio con parafilm, mientras que la hidromiel al 5 % v/v se conservó en el fermentador con la válvula airlock durante 3 días.

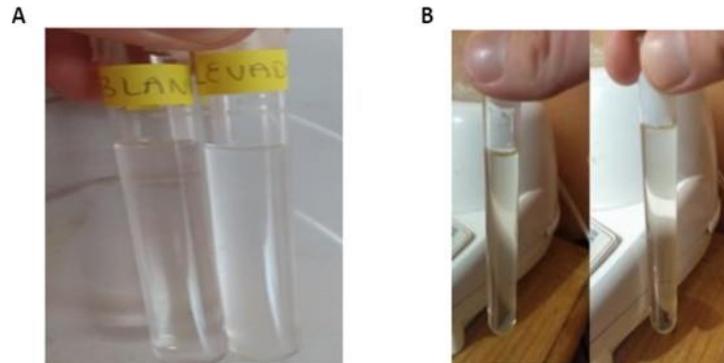


Figura 16. Blanco y medio de cultivo con levadura. A) caldo papa sacarosa 1 % m/v, B) hidromiel 5 % v/v. Medios de cultivo para realizar las mediciones de transmitancia (lux) vs tiempo (h). Los tubos de la izquierda son el blanco (medio sin levadura), mientras que los tubos de la derecha son el medio de cultivo con la levadura a tiempo cero.

8.3 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*: Pruebas piloto

Se tomaron lecturas de transmitancia del agua y blanco antes de iniciar el experimento y posteriormente se tomaron mediciones de los medios de cultivo con la levadura a los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 y 96 horas. Cabe resaltar que las mediciones obtenidas a partir de nuestro dispositivo fueron de transmitancia de la luz a través de la muestra (lux) vs tiempo (h). El ensayo se repitió 4 veces, y cada uno de los datos obtenidos de transmitancia (lux) para cada

tiempo (h) fue transformado a unidades de densidad óptica relativa (U.R.) mediante la **Ecuación 2** (Vidal, *et.al.*, 2014). Cada dato de densidad óptica se corrigió restándole el valor del blanco y se promediaron los cuatro datos de densidad óptica corregida para cada tiempo. La **Figura 17** muestra la densidad óptica relativa (U.R.) en función del tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 4 determinaciones independientes \pm E.E.

Se utilizó una escala de densidad óptica del cero al uno, siendo este último valor el crecimiento máximo posible de la levadura. Nuestro intervalo de valores posibles con sentido biológico para dicha magnitud va de 0.001 lux a 1 unidad lux.

8.3.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v (pruebas piloto)

Ejemplo de medición y determinación de crecimiento:

1° repetición: tiempo = 4 h, transmitancia = 0.097 lux

$$D.O. = -\log(T)$$

$$D.O. = -\log(0.097) = 1.013 U.R.$$

$$D.O. \text{ corregida} = D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ blanco}$$

$$D.O. c = 1.013 - 0.705 = 0.308 U.R.$$

Se promediaron los 4 datos de la D.O. corregida obtenidos para las 4 h:

$$0.308 \text{ U.R.} + 0.316 \text{ U.R.} + 0.297 \text{ U.R.} + 0.319 \text{ U.R.} = \frac{1.239}{4}$$

$$\overline{x \text{ D.O.}} = 0.309 \text{ U.R. para el tiempo de 4 h}$$

Tabla 1. Crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas piloto. Se reporta el promedio de cuatro determinaciones independientes de la D.O. relativa corregida (U.R.) \pm Error estándar (E.E.) vs tiempo (h) para el agua, blanco y el medio de cultivo con levadura.

Muestra	Tiempo (h)	\overline{x} D.O. relativa corregida (U.R.)	E.E.
Agua	0	0.699	0.000
Blanco	0	0.705	0.001
Medio de cultivo + Levadura	0	0.009	0.002
	1	0.032	0.004
	2	0.081	0.002
	4	0.309	0.006
	8	0.659	0.012
	16	0.797	0.008
	24	0.877	0.008
	48	0.953	0.009
	72	0.953	0.009
	96	0.953	0.009

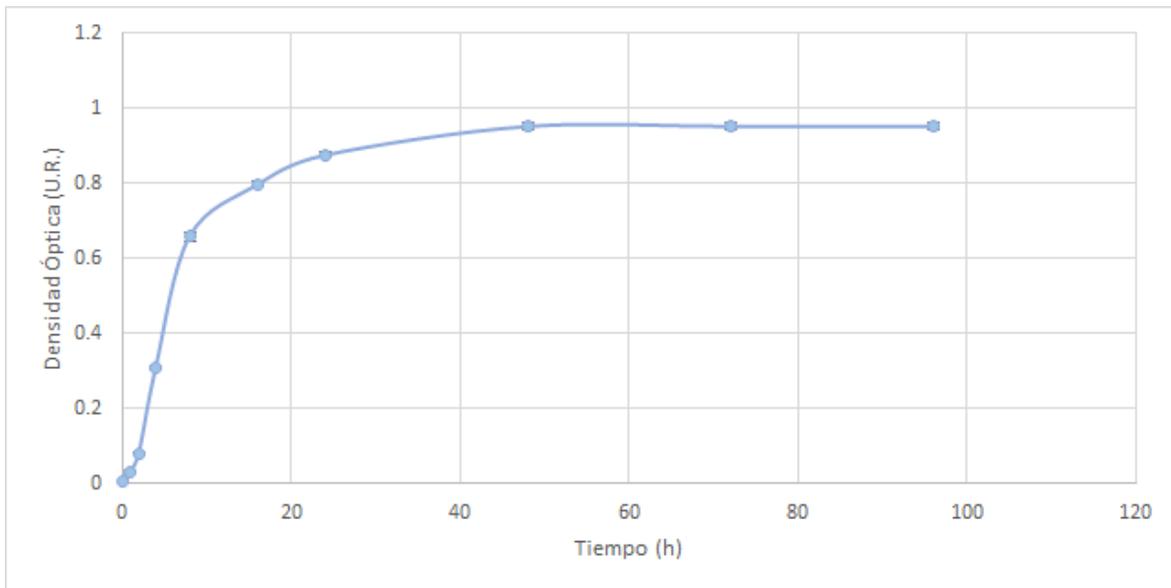


Figura 17. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas piloto. Relación de D.O. relativa corregida (U.R) vs tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 4 determinaciones independientes \pm E.E.

8.3.2 Crecimiento en Hidromiel al 5 % v/v (pruebas piloto)

Ejemplo de medición y determinación de crecimiento:

1° repetición: tiempo = 8 h, transmitancia = 0.046 lux

$$D.O. = -\log(T)$$

$$D.O. = -\log(0.046) = 1.337 \text{ U.R.}$$

$$D.O. \text{ corregida} = D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ blanco}$$

$$D.O. c = 1.337 - 0.712 = 0.625 \text{ U.R.}$$

Se promediaron los 4 datos de la D.O. corregida obtenidos para las 8 h:

$$0.625 \text{ U.R.} + 0.639 \text{ U.R.} + 0.649 \text{ U.R.} + 0.625 \text{ U.R.} = \frac{2.538}{4}$$

$$\bar{x} \text{ D.O.} = 0.635 \text{ U.R. para el tiempo de 8 h}$$

De esta manera se procedió con el manejo de datos de las demás mediciones.

Tabla 2. Crecimiento de *S. cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v. Pruebas piloto. Se reporta el promedio de cuatro determinaciones independientes de la D.O. relativa corregida (U.R.) \pm Error estándar (E.E.) vs tiempo (h) para el agua, blanco y el medio de cultivo con levadura.

Muestra	Tiempo (h)	\bar{x} D.O. relativa corregida (U.R.)	E.E.
Agua	0	0.699	0.000
Blanco	0	0.713	0.001
Medio de cultivo + Levadura	0	0.007	0.001
	1	0.019	0.004
	2	0.138	0.003
	4	0.359	0.006
	8	0.635	0.007
	16	0.804	0.003
	24	0.901	0.011
	48	0.963	0.012
	72	0.963	0.012
	96	0.963	0.012

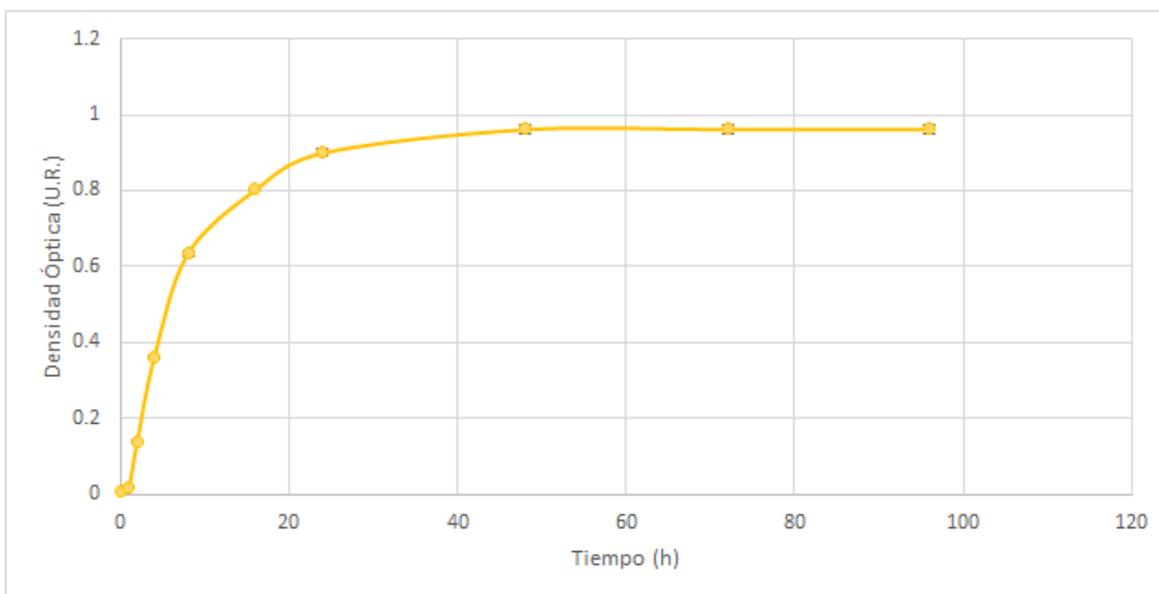


Figura 18. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v. Pruebas piloto. Relación de D.O. relativa corregida (U.R) vs tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 4 determinaciones independientes \pm E.E.

8.4 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*: Pruebas finales

Considerando que no se observaron cambios apreciables en la D.O. relativa corregida (U.R) después de las 48 h en las **Gráficas 1 y 2**, se decidió mejorar la resolución de ambas gráficas para las pruebas finales al redefinir los tiempos de muestreo que fueron: 0, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8, 16, 24 y 48 horas. Se obtuvo la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en ambos medios de cultivo y se reportó en gráficos de D.O. relativa corregida (U.R.) vs tiempo (h), que corresponden a los promedios de cuatro réplicas de cada medio de cultivo \pm E.E.

8.4.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v (pruebas finales)

Ejemplo de medición y determinación de crecimiento:

1° repetición: tiempo = 4 h, transmitancia = 0.103 lux

$$D.O. = -\log(T)$$

$$D.O. = -\log(0.103) = 0.987 \text{ U.R.}$$

$$D.O. \text{ corregida} = D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ blanco}$$

$$D.O. c = 0.987 - 0.703 = 0.284 \text{ U.R.}$$

Se promediaron los 4 datos de la D.O. corregida obtenidos para las 4 h:

$$0.284 \text{ U.R.} + 0.288 \text{ U.R.} + 0.286 \text{ U.R.} + 0.288 \text{ U.R.} = \frac{1.145}{4}$$

$$\bar{x} D.O. = 0.286 \text{ U.R. para el tiempo de 4 h}$$

De esta manera se procedió con el manejo de datos de las demás mediciones.

Tabla 3. Crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas finales. Se reporta el promedio de cuatro determinaciones independientes de la D.O. relativa corregida (U.R.) \pm *Error estándar* (E.E.) vs tiempo (h) para el agua, blanco y el medio de cultivo con levadura.

Muestra	Tiempo (h)	\bar{x} D.O. relativa corregida (U.R.)	E.E.
Agua	0	0.699	0.000
Blanco	0	0.706	0.000
Medio de cultivo + Levadura	0	0.011	3.175×10^{-5}
	1	0.032	9.327×10^{-5}
	1.5	0.054	1.612×10^{-4}
	2	0.082	2.543×10^{-4}
	3	0.151	5.088×10^{-4}
	4	0.286	1.136×10^{-3}
	8	0.756	9.289×10^{-3}
	16	0.896	7.189×10^{-3}
	24	0.952	8.305×10^{-3}
	48	0.987	5.092×10^{-3}

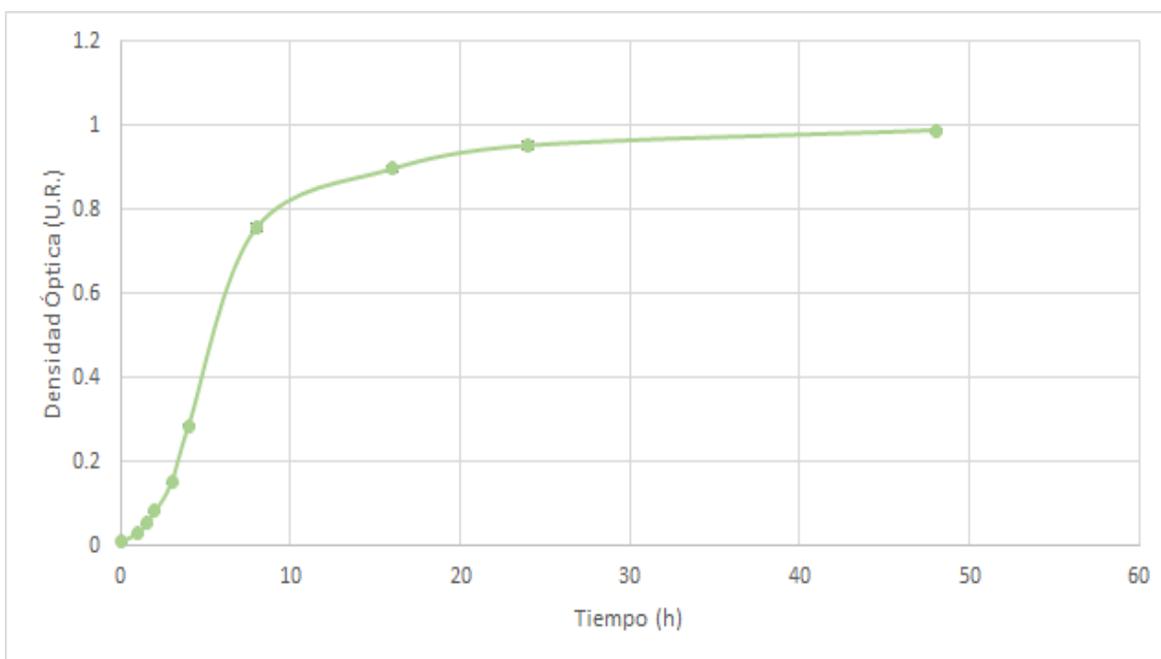


Figura 19. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Pruebas finales. Relación de D.O. relativa corregida (U.R) vs tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 4 determinaciones independientes \pm E.E.

8.4.2 Crecimiento en hidromiel al 5 % v/v (pruebas finales)

Ejemplo de medición y determinación de crecimiento:

1° repetición: tiempo = 4 h, transmitancia = 0.099 lux

$$D.O. = -\log(0.099) = 1.004 \text{ U.R.}$$

$$D.O. c = 1.004 - 0.714 = 0.289 \text{ U.R.}$$

Se promediaron los 4 datos de la D.O. corregida obtenidos para las 4 h:

$$0.289 \text{ U.R.} + 0.297 \text{ U.R.} + 0.288 \text{ U.R.} + 0.286 \text{ U.R.} = \frac{1.145}{4}$$

$$\bar{x} D.O. = 0.291 \text{ U.R. para el tiempo de 4 h}$$

De esta manera se procedió con el manejo de datos de las demás mediciones.

Tabla 4. Crecimiento de *S. cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v. Pruebas finales. Se reporta el promedio de cuatro determinaciones independientes de la D.O. relativa corregida (U.R.) \pm *Error estándar* (E.E.) vs tiempo (h) para el agua, blanco y el medio de cultivo con levadura.

Muestra	Tiempo (h)	\bar{x} D.O. relativa corregida (U.R.)	E.E.
Agua	0	0.699	0.000
Blanco	0	0.717	0.000
Medio de cultivo + Levadura	0	0.011	3.300×10^{-5}
	1	0.032	9.724×10^{-5}
	1.5	0.056	1.682×10^{-4}
	2	0.085	2.659×10^{-4}
	3	0.152	1.410×10^{-3}
	4	0.291	2.386×10^{-3}
	8	0.742	9.066×10^{-3}
	16	0.912	9.181×10^{-3}
	24	0.959	5.291×10^{-3}
	48	0.985	1.244×10^{-3}

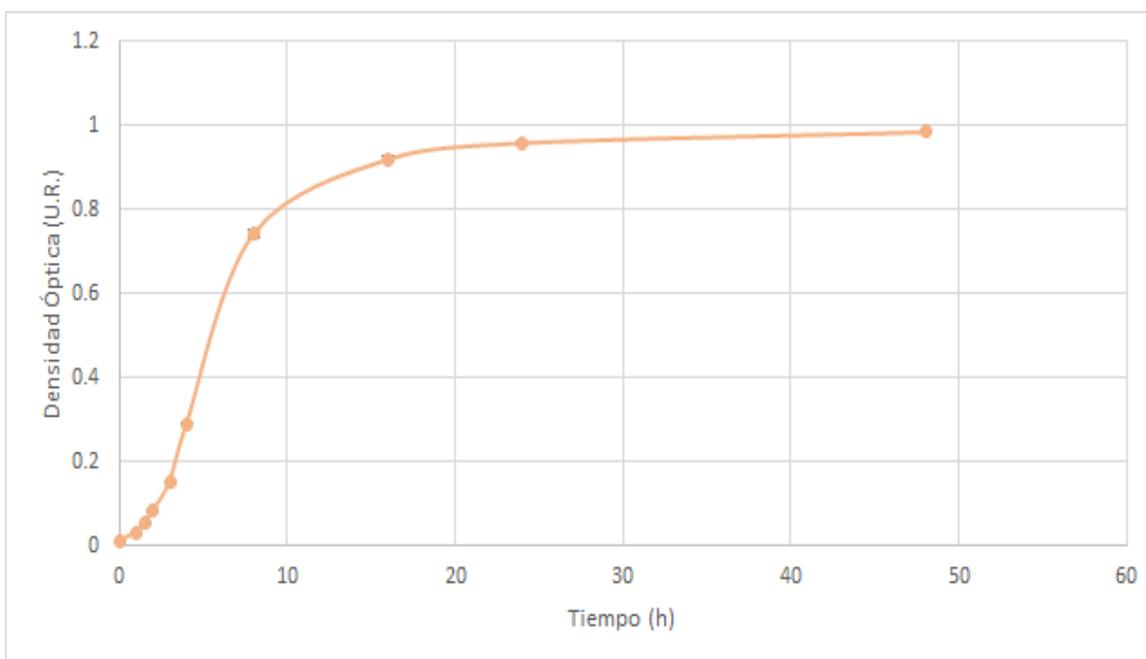


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v.

Pruebas finales. Relación de D.O. relativa corregida (U.R) vs tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 4 determinaciones independientes \pm E.E.

9. Discusión

9.1 Interfase gráfica de la app y pruebas de medición

La plataforma de programación utilizada en el presente trabajo fue MIT App Inventor[®], la cual es un software creado por el Instituto Tecnológico de Massachusetts y Google Education[®] para la elaboración de aplicaciones destinadas al sistema operativo Android[®]. En este ambiente gráfico, el usuario puede ir enlazando una serie de bloques (conjunto de herramientas básicas con funciones preestablecidas) para crear aplicaciones (MIT App Inventor[®], 2021). El dispositivo diseñado controla a un teléfono inteligente para que mida la intensidad de luz de un láser que emite luz roja a una longitud de onda de 680 nm, la cual fue incidida a través de la muestra y posteriormente esta última se transmitió al sensor de luz del teléfono. En este caso, se obtuvieron resultados de transmitancia de la luz a través de la muestra (lux) en función del tiempo (h) (MIT App Inventor[®], 2021).

La programación mediante bloques permite asignar funciones específicas dentro de la arquitectura del teléfono inteligente. Entre estas funciones destacan operaciones aritméticas, procesamiento de texto, control de sensores, etc. La

principal ventaja de este entorno radica en que es de fácil manejo para gente sin conocimientos avanzados de programación. Además, la plataforma es totalmente gratuita y cuenta con un foro de tutoriales, preguntas y respuestas que permiten guiar al usuario en caso de dudas. También cuenta con un emulador en tiempo real para que al escanear un código QR en el móvil se puedan hacer pruebas de la App sin necesidad de descargarla en el dispositivo inteligente. Esta plataforma es idónea para el desarrollo de aplicaciones científicas como captura de información en bases de datos, así como para mediciones con los diferentes sensores del teléfono inteligente. También se pueden crear juegos, exámenes, aplicaciones que usen el GPS integrado, lectura de código de barras y QR, etc. Algunas desventajas de esta plataforma consisten en la falta de tutoriales en castellano, pero al mismo tiempo, representan una oportunidad para publicar proyectos y que los usuarios de la plataforma los conozcan y utilicen en forma abierta. Otra desventaja es la falta de compatibilidad actual para el sistema operativo iOS® (MIT App Inventor®, 2021).

Por otro lado, Python® es otro entorno muy popular para crear aplicaciones. Esta plataforma hace uso de un lenguaje de código abierto, que consiste en un software creado *ex profeso* y que está a disposición de manera gratuita y otorgado con licencias para facilitar su reutilización o adaptación a contextos diferentes. Por lo tanto, requiere que el usuario tenga nociones básicas de programación. La principal ventaja es su versatilidad de usos, ya que en Python® se pueden hacer desde plataformas Web o de Streaming (Instagram®, Bit Bucket®, Pinterest®), hasta aplicaciones científicas como MATLAB® e inclusive funciones de inteligencia

artificial como complementos para Amazon® Alexa®. La principal desventaja de este entorno radica en la necesidad de tener conocimientos básicos de programación, además de la existencia precaria de tutoriales en castellano (Python®, 2021).

Con base en la vigésima edición del informe “State of the Developer Nation” realizado por la compañía SlashData® de noviembre de 2020 a agosto de 2021, JavaScript® fue la plataforma más utilizada para creación de aplicaciones (14 millones de usuarios), seguida de Python® con 10.1 millones de usuarios y cerrando el podio Java® con 9.4 millones de programadores. Además, C/C + +® está en el cuarto lugar con 7.2 millones de usuarios. MIT App Inventor®, se encuentra en el quinto lugar con 6.8 millones de usuarios (SlashData®, 2021). Pese a que la plataforma MIT App Inventor® está en quinto lugar en cuanto a utilización, es el entorno que más ha crecido de 2017 a la fecha, ya que el número de usuarios se ha triplicado. Esto nos quiere decir que un importante sector de la población que no posee conocimientos de programación se está animando a generar aplicaciones en dicha plataforma para utilizarlas en su vida cotidiana. Por esta razón, nosotros decidimos utilizar esta plataforma para que a través de un lenguaje lógico e intuitivo (construcción y seriación de bloques), obtuvieramos nuestra App móvil de manera rápida y sencilla.

Durante el diseño del dispositivo se utilizaron otras fuentes de luz. Sin embargo, estas no resultaron adecuadas en términos de potencia y por esa razón se decidió probar otras alternativas en cuanto a fuente de luz. Cabe aclarar que al principio

se utilizó una luz LED que emitía luz roja a 600 nm, pero como no era capaz de atravesar la muestra para llegar al sensor, este componente fue sustituido por un láser que emite luz roja a 680 nm. Lo anterior tiene sentido, ya que en la literatura, Barboza y colaboradores en 2010 reportaron que el diodo emisor de luz (LED) emite luz de forma muy divergente. Además, los fotones emitidos siguen una ruta dispersa y multidireccional (Barboza y cols., 2010). Lo anterior, los convierte en objetos idóneos para iluminación. Por otro lado, el diodo láser (LD) emite luz de forma convergente (Barboza y cols., 2010). Aunado a esto, los fotones emitidos siguen una ruta altamente coherente y enfocada. Esto los convierte en componentes ideales para técnicas ópticas y de electrónica. Los láseres son más potentes y por lo tanto, pueden transmitir la luz más lejos. Sin embargo, son mucho más caros y consumen más energía. (Juárez, 2013). Esta última característica no representó un problema para el presente trabajo, ya que se utilizó el láser diodo LD 680 nm, 4 mW, marca SHUANG.W[®] de potencia relativamente baja energizado por una batería para láser LR41H marca T&E[®] button cell 1.5 V.

En el centro del LED, existe una interacción ánodo-cátodo, que contiene orificios. Gracias a estos orificios, los electrones se desplazan a través de la unión, del polo positivo al negativo. En este proceso, los electrones cambian su estado. La energía extra liberada cuando los electrones cambian de estado hace que se emitan fotones. Estos fotones interactúan con los otros materiales utilizados en el LED y la corriente que lo atraviesa para emitir luz visible. Esta propiedad se llama electroluminiscencia (López, 2006).

En cuanto al láser, las emisiones de fotones están estimuladas para crear un bucle de retroalimentación. Todos los fotones están en fase entre sí y tienen la misma longitud de onda, es decir, son monocromáticos. Esencialmente, un haz de fotones es responsable de llenar gradualmente una cámara compuesta por un cilindro espejado. Esta superficie refleja los fotones de vuelta a los átomos dentro de la cámara, excitando sus electrones. Estos electrones en un estado excitado quieren liberar la energía extra, que de nuevo es en forma de un fotón. Este fotón recién liberado se añade al haz de fotones dentro de la cámara, amplificando el proceso de reflexión y excitación. Una vez que se liberan suficientes fotones, una cavidad de escape de luz permite que se emita un rayo de luz láser estrecho, brillante y enfocado (Juárez, 2013).

Aunado a esto, la utilización del láser que emite luz roja a 680 nm fue correcta, ya que en la literatura se menciona que las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* absorben luz a longitudes entre 600-700 nm, mientras que las bacterias absorben aproximadamente a 540 nm e inclusive también hasta 600 nm. Finalmente el máximo de absorción de los protozoarios ronda los 580-600 nm (Kieliszek, *et.al.*, 2016). De igual manera, Abonyi y colegas en 2019 determinaron la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* midiendo la D.O. relativa a 600 nm (Abonyi, *et.al.*, 2019). También, Malairuang y colegas en 2020 determinaron la D.O. relativa de esta levadura a 620 nm (Malairuang, *et.al.*, 2020).

Actualmente no existen turbidímetros portátiles que utilicen un sensor de luz diseñado en MIT App Inventor®. Saucedo y colaboradores en 2020 reportaron un

bosquejo general para el diseño de un sensor de luz y mencionan algunas aplicaciones espectrofotométricas y en especial la posibilidad de medir la turbidez del agua, así como el control de la iluminación de los focos en una casa inteligente (Saucedo, *et.al.*, 2020). Además de esta publicación, solo existen tutoriales de tipo educativo sobre los sensores de luz, pero no se menciona el enfoque de este sensor para utilizarlo como parte fundamental en un turbidímetro portátil (MIT App Inventor®, 2021).

Existen diversos turbidímetros portátiles que están reportados en la literatura y la mayoría están enfocados en la medición de la turbidez del agua para determinar su calidad, así como para la detección de microorganismos (Kelley, *et.al.*, 2014). Lo curioso es que todavía no hay reportes de la estimación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando turbidímetros caseros.

Por ejemplo, Kelley y colaboradores en 2014 reportaron un turbidímetro de bajo costo para su uso en países de escasos recursos para la evaluación de la calidad del agua potable. Su diseño consiste de un LED y un sensor de luz a frecuencia desarrollado en Java®, así como un microprocesador tipo Arduino® (Kelley, *et.al.*, 2014). Otro aspecto relevante en este trabajo fue la calibración de su prototipo con una suspensión coloidal de aceite en agua destilada, en lugar de utilizar formazina según lo recomendado por la Norma ISO 7027-1. Nosotros no podemos basarnos en esta metodología ya que el sensor de luz a frecuencia era muy complejo, (Kelley, *et.al.*, 2014).

Metzger y colegas en 2018 desarrollaron un nuevo turbidímetro nefelométrico con un cable de fibra óptica sumergido en el vial con la muestra para dejar aparte los componentes electrónicos. Esta fibra óptica se utiliza para canalizar la luz transmitida en la muestra (fenómenos de absorbencia) y para que lleguen al sensor receptor (Metzger, *et.al.*, 2018). Con respecto a este diseño nosotros habíamos probado la utilización de una fibra optica para que transmitiese toda la luz que era incidida a través de la muestra sin que se fugara, pero no fue un diseño conveniente porque llegaba muy poca luz al sensor del Smartphone y finalmente la fibra óptica fue removida tanto del prototipo de interfase de medición del crecimiento de la levadura en cartón, como de la interfase final en madera.

Kirkey y colaboradores en 2018 reportaron un turbidímetro portátil consistente en una fuente de luz LED, con un sensor de luz de frecuencia continua desarrollado en Python® y una cámara para contener la muestra fabricada en plástico. Esta última resultó un buen aislante de la luz ambiental para que no afectara los resultados (Kirkey, *et.al.*, 2018). Por otro lado, nuestro prototipo de interfase de medición del crecimiento de la levadura en cartón no tenía buena resistencia y no aislaba adecuadamente a la muestra de la luz ambiental. Por lo anterior y siguiendo las recomendaciones de las perspectivas de dicho artículo, decidimos realizar la interfase final de medición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en madera triplay barnizada.

Gillet y colegas en 2019 desarrollaron un turbidímetro portátil que consistía en un sensor de luz realizado en Java®, una fuente de luz LED infrarroja y software

basado en Arduino Uno (Gillet, *et.al.*, 2019). Basándonos en este trabajo, nosotros decidimos sustituir la luz LED por un láser que emite luz roja a 680 nm, ya que la ruta de los fotones es altamente convergente y es una luz más potente y enfocada que con respecto al LED y esto correspondió con lo que encontraron dichos autores y también con lo mencionado anteriormente por Barboza en 2010 (Barboza, *et.al.*, 2010).

Con respecto al precio de los dispositivos, Sperandio y colaboradores en 2021 reportaron un turbidímetro portátil compuesto por una fuente de luz LED PHIV 459 que emitía luz a 940 nm, una cámara de medición diseñada en impresora 3D, además de un fototransistor y un Arduino Uno para la interpretación de resultados. El precio del dispositivo es equivalente a \$1500 MXN sin contar el Smartphone (Sperandio, *et.al.*, 2021). Por otro lado, Sappat y colegas en 2011 diseñaron un turbidímetro portátil para detección del virus que provoca el síndrome de Taura en camarones, haciendo uso de reacciones RT-LAMP por turbidimetría a una temperatura de $60-65 \pm 0.2$ °C. Constaba de cinco componentes principales: unidad de bloque calefactor, un sistema de medición de turbidez, un circuito amplificador de señal, un convertidor analógico a digital (ADC) y una unidad microcontroladora (MCU) conectada con una pantalla de cristal líquido (LCD), cuyo precio era el equivalente a \$1830 MXN (Sappat, *et.al.*, 2011). De lo anterior podemos confirmar que nuestro dispositivo es más sencillo y rápido de realizar y su precio no supera los \$500 MXN sin contar el teléfono inteligente.

Aunado a esto, el sensor de luz que nosotros utilizamos se conoce como sensor de luz ambiental o sensor ALS (Ambient light sensor). Este es uno de los sensores integrados en los teléfonos inteligentes más usados en la actualidad (MIT App Inventor[®], 2021). Se trata de un fotodiodo con un rango de detección espectral de 350 nm-1000 nm. Asimismo, el fotodiodo tiene un rango de medición de 0 lux a 20,000 lux con una resolución de 0.001 lux. El ALS usualmente está ubicado en la parte frontal del Smartphone y es usado para minimizar el consumo de energía de batería del dispositivo, ya que al sensor cambios en la luz ambiental los teléfonos inteligentes pueden ajustar cambios en el control del brillo del panel de manera automática (Mouser Electronics, 2021). Por lo anterior, el ALS podría ser usado como una alternativa al fotodetector de un laboratorio, ya que este posee un alto rango dinámico y una buena resolución acoplados a un hardware de un dispositivo inteligente. Estas características de diseño son idóneas para desarrollar aplicaciones de análisis, interpretación y transmisión de datos espectroscópicos (Hussain, *et.al.*, 2021).

En este sentido, Zhu y colaboradores reportaron en 2012 el desarrollo de un dispositivo para la detección de *Escherichia coli* enteropatogénica en muestras líquidas. En este caso, el dispositivo consistía de una fuente de luz LED (la cual excitaba las partículas de *E. coli* que se encontraban en un capilar), el sensor de luz del dispositivo y la cámara frontal mediante la cual se obtenía una imagen de las bacterias (Zhu, *et.al.*, 2012). De igual manera, Liang y colegas en 2015 reportaron el diseño de un dispositivo que utiliza el ALS de un Smartphone para obtener imágenes fluorescentes de nanopartículas en ensayos de transferencia de

energía por resonancia Foster (FRET) de baliza molecular. Esta tecnología permite detectar secuencias de ácidos nucleicos de una muestra líquida (Liang, *et.al.*, 2015). La relevancia de los Smartphones con aplicaciones científicas o médicas ha traspasado fronteras en los últimos años. Por ejemplo, Wajih y colaboradores en 2019 reportaron un fluorómetro portátil que utiliza un Smartphone para la detección de la señal de fluorescencia emitida por una línea celular de cáncer de mama modelo, diseñada para expresar de manera estable la proteína verde fluorescente (GFP) (Wajih, *et.al.*, 2019). Finalmente, Wei y colegas en 2013 reportaron la creación de un fluorómetro portátil basado en un teléfono inteligente para detectar partículas virales aisladas de citomegalovirus humano marcadas con fluorescencia. (Wei, *et.al.*, 2013).

9.2 Pruebas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en diversos medios de cultivo

Para probar el funcionamiento del dispositivo detallado en la presente tesis, se decidió utilizar medios de cultivo de fácil preparación en el hogar. En este caso el caldo papa sacarosa al 1 % m/v se obtuvo al realizar una adaptación del medio reportado por Merck Millipore en 2021, el cual es caldo papa dextrosa al 1 % (Merck Millipore, 2021). El caldo papa sacarosa está compuesto primeramente por papa; un tubérculo cuya composición radica en: almidón, azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), lípidos, vitamina C, tiamina, vitamina B6, minerales (fósforo, cloro, azufre, magnesio, hierro, etc.), fenoles y glicoalcaloides (CONAPA, 2021).

En el presente medio de cultivo la papa es la principal fuente de nitrógeno aunque también es una fuente de carbono y de otros factores de crecimiento. Por otro lado, la sacarosa es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa. Se le conoce como azúcar de mesa (Romero, *et.al.*, 2019). Se prefirió por ser el azúcar que tenemos en casa y resultó la principal fuente de carbono del experimento. *Saccharomyces cerevisiae* posee una enzima llamada β -fructofuranosidasa, que es comúnmente nombrada invertasa. Dicha enzima lleva a cabo la hidrólisis de la sacarosa en sus monómeros (glucosa y fructosa) para que sean aprovechados por la levadura (Romero, *et.al.*, 2019). Por otro lado la hidromiel al 5 % v/v consistía de agua y miel de abeja mexicana. Entonces la levadura utilizará de la miel los factores de crecimiento y los azúcares necesarios para desarrollarse y fermentarla bebida.

La hidromiel es un tipo de cerveza artesanal, es decir, es una bebida de bajo contenido alcohólico (5-8 % v/v) elaborada por medio de la fermentación de extracto amiláceo de cereales, en cuyo proceso de fabricación, no se añaden conservadores o aditivos químicos. Se hierve la miel con una cantidad de agua proporcional, de forma que se obtiene un mosto dulce con los azúcares suficientes para fermentar la bebida. Al añadir la levadura y dejar fermentar durante unos días se obtiene la hidromiel (Gobierno de México, 2017).

La miel es una matriz muy compleja y se define por la Norma Mexicana F-036 como: sustancia dulce producida por las abejas *Apis mellifera*, a partir del néctar de las flores. Las abejas la producen, transforman y almacenan en sus panales, de

los cuales se extrae el producto (NMX-F-036, 2006). Su composición química consiste en: agua, carbohidratos (fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa), proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales. La abeja contribuye a su estabilización añadiendo enzimas como la invertasa (Archundia, *et.al.*, 2014).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue obtenida mediante sobres de levadura comercial de la marca TRADI-PAN®. Esta última es una cepa sometida a un proceso de deshidratación. Los agregados deshidratados de levaduras consisten de pequeños cilindros beige con una superficie porosa (TRADI-PAN®, 2008). La cantidad inicial de levadura en ambos medios de cultivo fue de 11 g debido a que el marbete del producto recomendaba su utilización completa para evitar que perdiera sus propiedades y su poder fermentativo al estar expuesta al ambiente (TRADI-PAN®, 2008). Sin embargo, al obtener medios de cultivo muy turbios, el haz de luz del láser no era capaz de atravesar la muestra y por ende no obtuvimos señal de transmitancia (lux) vs tiempo (h) en las pruebas preliminares. Fue hasta que decidimos disminuir la cantidad de levadura (1 g en cada medio de cultivo), que ya obtuvimos lecturas adecuadas para caracterizar la cinética de crecimiento de la levadura.

Se esperaba que el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en ambos medios fuese similar al reportado por Alcázar y colegas en 2018, donde se menciona que los principales elementos que ayudan a la levadura a su crecimiento son el carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Debido a que estos elementos son los constituyentes elementales de sus componentes celulares clave (carbohidratos,

lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). El fósforo y el azufre también son importantes en este aspecto. El calcio, magnesio, potasio, hierro y sodio, entre otros, son utilizados por la levadura en pequeñas cantidades, debido a que sirven como cofactores, e incluso como reguladores de estrés por temperatura y etanol en el caso particular del magnesio (Alcázar, 2018). Además, Molina y colegas en 2005, reportaron que el potasio resulta indispensable para el crecimiento de las levaduras en cantidades relativamente pequeñas (10^{-2} a 10^{-4} mol/L). El calcio y el magnesio forman parte de los cofactores y de la pared celular, siendo el magnesio fundamental para la estabilidad del ATP y de enzimas; se le emplea a una concentración de 0.25 g/L. La tiamina y la biotina aceleran el proceso de fermentación. Esta última participa en la fijación de CO₂ y en la síntesis de ácidos grasos es requerida en una cantidad de 0.75 a 2.25 ppm (Molina, *et.al.*, 2005).

De igual manera, Salari y colaboradores en 2017 reportaron que *S. cerevisiae* puede utilizar en forma diferencial fuentes de carbono en función de si crece aeróbicamente o anaeróbicamente. Si crece aeróbicamente, la galactosa y la fructosa son los mejores azúcares de fermentación. Mientras que de forma anaeróbica, la levadura preferirá siempre a la glucosa. Todas las cepas requieren fuentes de nitrógeno y fósforo para crecer. El nitrógeno lo consumen en forma de amoníaco y urea. Utilizan fosfato monobásico como fuente de fósforo. También necesitan azufre y varios metales como el magnesio para un crecimiento óptimo (Salari, *et.al.*, 2017).

Un factor que implicó un reto para completar el presente trabajo fue la elaboración de medios de cultivo con las características necesarias de esterilidad y facilidad en su elaboración. Durante la preparación de los medios de cultivo nos enfrentamos a diferentes desafíos. El primero de ellos fue la creación de zona aséptica para evitar la contaminación de nuestros medios de cultivo. Para entrar en contexto con la importancia de mantener una zona aséptica, la Organización Panamericana de la Salud en 2012 define a la “asepsia” como un término que se refiere a un estado libre de gérmenes (OPS, 2012). Aunado a esto, como el proyecto fue realizado en casa, si no se mantiene una zona aséptica adecuada, podríamos tener contaminación de microorganismos que se encuentren en el aire y en las superficies de nuestro hogar, en especial de nuestra cocina. Por lo tanto, Hurst y colegas en 2007 mencionan que el aire es un medio de transición y no de soporte (Hurst, *et.al.*, 2007). Por ende, no posee una población microbiana autóctona. Sin embargo, un estudio realizado por Gómez y colegas en 2011, demostró que la cocina y el baño constituyen los lugares del hogar más susceptibles a la contaminación microbiana debido a la cantidad y la variedad de microorganismos presentes en estos espacios que superan con creces los de otros ambientes. Esta concentración de microorganismos en la cocina se debe al constante tránsito de los diferentes miembros de la familia, así como a la diversidad de los alimentos manipulados. Los microorganismos se depositan sobre las superficies formando biofilms (Gómez, *et.al.*, 2011).

En el presente proyecto no contábamos con un mechero Bunsen para generar una zona aséptica como en los laboratorios de microbiología. Sin embargo, resolvimos

este problema preparando ambos medios de cultivo e inoculando a *Saccharomyces cerevisiae* cerca del quemador encendido de una estufa marca Mabe®. Lo anterior fue una buena decisión ya que según la ficha técnica del mechero Bunsen comercial marca Humboldt® modelo h-5870, se trata de un instrumento utilizado en los laboratorios para calentar o esterilizar muestras, siendo éste un quemador de gas, y la llama es el producto de la combustión de una mezcla de aire y gas butano, aunque también funciona con gas natural. Este instrumento produce 1,200 BTU (Humboldt®, 2021). Por otro lado, la ficha técnica de la estufa marca Mabe® modelo IO7686SS, reporta que se trata de un equipo electrodoméstico con cinco quemadores que funcionan con suministro de gas natural o LP y el quemador frontal derecho produce 14,975 BTU (Mabe®, 2021).

La Organización Internacional de Normalización en su Norma ISO/ IEC 17025: 2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, en su apartado de calibración de presiones y flujos de los instrumentos, se reporta que lo mínimo necesario de capacidad de calor/m² que debe mantener un instrumento para generar una zona de asepsia es de 1200 BTU (ISO/IEC 17025, 2017). Por lo anterior, podemos confirmar que nuestra estufa casera brindó una adecuada zona aséptica con base en la normatividad (ISO/IEC 17025, 2017).

Otro reto fue la esterilización de los medios de cultivo. Poniéndonos en contexto con la importancia de la esterilización de los medios de cultivo, Madigan y colegas en 2015 mencionaron que la esterilización es la destrucción completa de todos los

microorganismos, incluidas las formas latentes y resistentes como esporas bacterianas, virus sin envoltura (no lipídicos) y hongos. Lo anterior puede conseguirse mediante esterilización física (calor húmedo y seco), gaseosa (óxido de etileno y vapor de formaldehído) y química (ácido peracético al 0.2 % y glutaraldehído al 2 %) (Madigan, *et.al.*, 2015). Aunado a esto, Murray y colegas en 2012 mencionaron que los esterilizantes físicos como el calor seco y calor húmedo, son los métodos de esterilización más utilizados en los hospitales y laboratorios, ya que están recomendados para la mayoría de los materiales, excepto aquellos que son termosensibles o los que poseen componentes químicostóxicos o volátiles (Murray, *et.al.*, 2012).

La esterilización por calor húmedo destruye los microorganismos por coagulación de sus proteínas celulares (Tortora, *et al.*, 2007). El principal método de esterilización que emplea calor húmedo es la esterilización por vapor a presión. Esta última se lleva a cabo en un autoclave. Dichos equipos emplean vapor de agua saturado a una presión de 15 lb/in², lo que permite que la cámara alcance una temperatura de 121 °C. El tiempo de esterilización usualmente es de 15 minutos. Éste es el método de elección para esterilizar materiales penetrables por vapor, así como termoestables y no sensibles a la humedad (Tortora, *et.al.*, 2007).

En el presente proyecto se logró la esterilización de los medios de cultivo por medio de la ebullición de ambos medios para evitar también la contaminación por microorganismos presentes en el aire o superficies de casa-habitación. Santambrosio y colegas en 2009 reportaron que la esterilización mediante

ebullición inactiva a las células vegetativas bacterianas, levaduras y hongos (incluyendo esporas). Por lo tanto, cuando solo es necesario conseguir una esterilización “relativa”, puede recurrirse a este método, ya que algunas esporas bacterianas suelen ser resistentes a la temperatura de ebullición del agua (Santambrosio, *et.al.*, 2009). Según datos de Castañeda y colegas en 2016, a los 2,200 metros sobre el nivel del mar de la Ciudad de México, el agua tiene una temperatura de ebullición de 93 °C (Castañeda, 2016).

Un desafío adicional fue el almacenamiento de los medios de cultivo, ya que Suarez y colegas en 2016 reportaron que las mejores condiciones de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* son a pH entre 4.5 a 6.5, aunque *S. cerevisiae* puede tolerar medios con pH entre 3 y 10. Es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos para no favorecer una disminución en el volumen celular, el cual afecta también la velocidad de fermentación y la viabilidad celular. Se recomienda una temperatura de 25 a 30 °C (temperatura ambiente) para un crecimiento óptimo de las levaduras, ya que las altas temperaturas ocasionan estrés térmico y una consecuente disminución de la biomasa, producto de un descenso en el contenido de proteínas, RNA, DNA y aminoácidos libres e induce a la rigidez de la membrana celular. Por otro lado, las temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula deteniendo su desarrollo (Suárez, *et.al.*, 2016).

La solución a este reto fue conservar el caldo papa sacarosa al 1 % m/v en un frasco de vidrio con parafilm, mientras que la hidromiel al 5 % v/v se conservó en

el fermentador con la válvula airlock durante 3 días. Ambos medios conservados a temperatura ambiente. De esta manera se favoreció la anaerobiosis y por ende la fermentación alcohólica. Cabe aclarar que a cada tiempo se tomaba una alícuota de 3 mL de ambos medios de cultivo en zona aséptica (con ayuda de dos recipientes medidores para jarabe), en nuestros tubos de ensayo cubiertos con parafilm y bien etiquetados para realizar la medición de transmitancia de la luz a través de la muestra (lux) vs tiempo (h) (**Figura 16**).

Otro desafío fue la medición de solutos y disolventes porque en casa no contamos con instrumentos de medición como en el laboratorio. El problema se resolvió utilizando una taza medidora marca Yuliana[®] para medir disolventes (agua), cuya capacidad fue de 50 mL a 650 mL (Yuliana[®], 2021). En cuanto a la alícuota de 3 mL de cada medio de cultivo se utilizaron recipientes medidores para jarabe marca MAVER[®], cuya capacidad consiste de 2 mL a 15 mL (MAVER[®], 2021). Para el caso de solutos se utilizó una balanza digital para cocina marca QMOSHEN[®] modelo Q40, cuya capacidad fue de 1 g a 10,000 g (QMOSHEN[®], 2021). Cabe aclarar que los instrumentos de cocina utilizados no reportan su grado de error asociado a la medición en sus fichas técnicas, pero es evidente que carecen del grado analítico como sus análogos que se utilizan en los laboratorios de enseñanza o industria y por lo tanto, tienen un mayor error asociado a la medición.

9.3 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*: Pruebas piloto

Los tiempos elegidos para la construcción de las gráficas de densidad óptica relativa (U.R.) vs tiempo (h) para obtener la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se fundamentaron con respecto al tiempo de duplicación o generación reportado de la levadura, el cual es de alrededor de 90 minutos (Mateos, *et.al.*, 2007). Siguiendo el razonamiento anterior, para las mediciones detalladas en la presente tesis tendríamos que tomar mediciones de densidad óptica relativa cada 90 minutos durante 24 a 48 horas. Sin embargo, en la literatura se reportan tiempos más prolongados de las mediciones para observar cambios apreciables en la cinética de esta levadura con la finalidad de estudiar sus fases de crecimiento.

Mateos y colegas en 2007 fundamentan que el tiempo de generación se refiere al intervalo que transcurre en la formación de dos células a partir de una célula. Es decir, el tiempo requerido para que una célula se divida, o bien, la población microbiana se duplique (Mateos, *et.al.*, 2007). La reproducción de esta levadura en condiciones normales es asexual (mitosis) y se conoce como gemación. En esta, se forman yemas o blastosporas que dan origen a células haploides. Solo en condiciones de estrés se combinan dos células para formar un cigoto diploide y después de la meiosis, se forman cuatro esporas sexuales conocidas como ascosporas, que al germinar producen nuevas células haploides (Mateos, *et.al.*, 2007).

También se ha reportado en la literatura que el tiempo de duplicación de *Saccharomyces cerevisiae* depende de la composición del medio de cultivo. Por ejemplo, Gómez y colaboradores en 2015 reportaron un tiempo de duplicación de 0.86 h, utilizando harina de soya como ingrediente principal en su medio de cultivo, lo que nos quiere decir que un medio compuesto por harina de soya es una buena alternativa para el crecimiento efectivo y rápido de *Saccharomyces cerevisiae* considerando la gran velocidad específica a la cual crecen las levaduras. En este estudio, los datos de D.O. vs tiempo comprenden de 0 a 24 h, tomando mediciones cada 2 h (Gómez, *et.al.*, 2015). Mientras que Pérez y colegas en 2011, utilizando diluciones de agua de coco en su medio de cultivo, reportaron un tiempo de generación para esta levadura de 1.82 h. Esto quiere decir que también es una buena alternativa de medio de cultivo y lo importante es la suplementación del medio con biotina, la cual ayuda a la fijación de CO₂ por parte de la levadura y hace más eficiente el proceso de fermentación. Las gráficas de D.O. vs tiempo en este estudio comprenden de 0 a 30 h tomando mediciones cada 2 h (Pérez, *et.al.*, 2011). Por otro lado, Cáceres y colegas en 2002, utilizando jugo de uva como medio de cultivo, y sin ningún otro factor de crecimiento, reportaron un tiempo de duplicación de 3.3 h, lo cual nos dice que el mosto de uva no cubre los requerimientos que precisa la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para su rápido y eficiente crecimiento. Las gráficas de D.O. vs tiempo comprenden de 0 a 48 h, tomando mediciones cada 2 h (Cáceres, *et.al.*, 2002). De igual manera Altamirano en 2013, utilizando un medio de cultivo compuesto por mosto cervecero, reportó un tiempo de generación de 1.42 h. Esto quiere decir que el

mosto cervecero a pesar de ser una matriz compleja, proporciona un medio óptimo para el desarrollo de la levadura, aunque cabe aclarar que al tener más sustratos, la adaptación al medio por parte del microorganismo será mayor que con respecto al medio donde utiliza la soya. Los gráficos de D.O. vs tiempo en este estudio comprenden de 0 a 48 h, tomando mediciones cada 2 h al principio y una vez que se alcanzan las 8 h, se tomaron mediciones a las 12, 16, 24 y 48 h (Altamirano, 2013). Nuestros tiempos de medición son similares a los propuestos por Altamirano.

Se utilizó una escala de densidad óptica del cero al uno, siendo este valor el crecimiento máximo posible de la levadura. En nuestro caso, como adoptamos una expresión que maneja un logaritmo negativo de la transmitancia (**Ecuación 2**), nuestro intervalo de valores posibles con sentido biológico para dicha magnitud van de 0.001 lux a 1 unidad lux, porque a valores mayores de 1 unidad lux de transmitancia, la D.O. relativa es negativa y esto carece de sentido biológico. Es común que en la literatura cada autor opte por manejar la escala de densidad óptica (sea relativa o absoluta), que más se adapte a sus necesidades. Por ejemplo, Abonyi y colegas utilizaron una escala de D.O. relativa que comprendede 0 a 3.5 U.R. (Abonyi, *et.al.*, 2019). También, Malairuang y colaboradores midieron la D.O. relativa en una escala que va de 0 a 2.5 unidades relativas (Malairuang, *et.al.*, 2020). De esta manera, Papapetridis y colegas en 2018 construyeron gráficas de D.O. relativa de 0 a 3 U.R. para *Saccharomyces cerevisiae* (Papapetridis, *et.al.*, 2018). Lainioti y colaboradores en 2011 reportaron

gráficas de D.O. (U.R.) vs tiempo (h) para dicha levadura. La densidad óptica relativa estaba comprendida entre 0 a 6 U.R. (Lainioti, *et.al.*, 2011).

En cuanto a la fermentación como tal, en la literatura se reporta que para fermentaciones de laboratorio y artesanales, generalmente la duración es de 24-48 h. Lo anterior depende de la preparación y composición del mosto y la levadura que se utilice (Linko, *et.al.*, 1998). Estos valores de tiempo corresponden con el tiempo total de fermentación reportado en el presente trabajo, ya que se alcanzó la fase estacionaria a partir de las 24 h. Por otro lado, la etapa de fermentación en la elaboración de cerveza generalmente dura una semana a una temperatura de 20 °C (Vincent, *et.al.*, 2006). Durante este proceso el mosto es transformado en un líquido con determinado contenido de alcohol etílico. Al inicio de la fermentación, la levadura comienza su proceso de reproducción. El desarrollo de esta etapa depende de la disponibilidad de oxígeno, fuentes de nitrógeno y de algunos otros nutrimentos. Cuando el oxígeno es consumido, la reproducción celular se detiene y comienza el proceso anaerobio en el que la glucosa se transforma en etanol y CO₂ (Vázquez, *et.al.*, 2007). La secuencia de transformaciones para degradar una molécula de glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso complejo que involucra dos etapas: (1) la formación en anaerobiosis de dos moléculas de piruvato a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (glucólisis) y (2) la descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para dar lugar a dos moléculas de acetaldehído que se reducen a dos moléculas de etanol (Hernández, *et.al.*, 2003).

Un sistema fermentativo se define como el volumen de reacción limitado por un contenedor físico (biorreactor). Donde se lleva a cabo la degradación biológica anaerobia de moléculas orgánicas mediante la acción de ciertas enzimas que actúan directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras (Sánchez, 2011). El biorreactor más simple es el matraz Erlenmeyer (Hernández, *et.al.*, 2003). Con base en su alimentación, los biorreactores se pueden operar en: Lote (que se utiliza para la producción de bebidas alcohólicas, aminoácidos, enzimas y ácidos orgánicos), lote alimentado (que resulta útil para la producción de penicilina y la levadura para panificación) y continuo (el cual es útil para la producción de bioetanol y tratamiento de efluentes) (Ruíz *et al.*, 2007). Aunado a esto, también se reporta el cultivo semicontinuo el cual es utilizado para la caracterización de células animales como el hibridoma murino 1E10, así como el crecimiento de microalgas (Victores, *et.al.* 2008).

En el presente trabajo se utilizaron biorreactores caseros para los medios de cultivo. Para el caldo papa sacarosa al 1 % m/v se utilizó un fermentador construido con un frasco de vidrio y parafilm, mientras que para la hidromiel al 5 %v/v se utilizó un fermentador de plástico con una válvula airlock que favorece la anaerobiosis. Ambos biorreactores se fundamentan en la operación de cultivo en lote (Batch culture). Dutta y colegas en 2008 reportaron que en este sistema de fermentación inicialmente se añade al biorreactor una solución rica en nutrimentos (concentración de sustrato, S_0) la cual se inocula con microorganismos (concentración de biomasa, X_0) que producen un determinado producto de interés

(concentración de producto, P). La multiplicación celular cesa por limitación de nutrientes y/o acumulación de productos tóxicos de excreción celular. Una vez que se ha alcanzado el nivel deseado de fermentación (S, X, P), el biorreactor se vacía, se lava, se esteriliza y el proceso se repite. Los cambios en los componentes del medio de fermentación dentro del biorreactor producen a su vez cambios en el metabolismo celular. (Dutta, *et.al.*, 2008). Las ventajas de los biorreactores que utilizan esta modalidad de fermentación consisten en: bajo riesgo de contaminación, flexibilidad operacional cuando el fermentador se utiliza para distintos productos, manejo eficiente entre lote y lote y costos de operación bajos (Villadsen, *et.al.*, 2011). Las principales desventajas de este modo de operación son tiempos muertos largos que se presentan al momento de vaciar, limpiar y esterilizar el biorreactor para la siguiente fermentación; adicionalmente, este proceso requiere de mucha mano de obra, control y optimización del proceso complejos y existe el riesgo de mayor variabilidad entre lotes (Rao, *et.al.*, 2010). En el presente trabajo se utilizó este último método por ser de bajo costo y de relativa facilidad al acoplarlo en casa. Además, Castro y colaboradores mencionaron que el sistema por lote de fermentación es el más empleado en la industria cervecera, obteniendo una cinética típica para caracterizar a las levaduras en las diversas fases de su crecimiento (Castro, *et.al.*, 2020).

Una vez explicada la modalidad de fermentación que se llevó a cabo, conviene resaltar que el comportamiento del crecimiento de la levadura en el tiempo se

representa por una curva de crecimiento, la cual consiste generalmente en cuatro fases (Hernández, *et.al.*, 2003).

1) Fase lag. Representa el periodo de adaptación de la levadura a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. En esta fase no existe aumento drástico en el número de células debido a que la levadura utiliza la energía disponible para sintetizar las enzimas que requiere para su desarrollo en el nuevo medio (Sánchez, 2011).

2) Fase logarítmica o exponencial. En esta fase las células están adaptadas y se multiplican en forma acelerada. La velocidad de crecimiento puede ser cuantificada con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo (Sánchez, 2011). En este punto, las células se reproducen sin limitación de nutrientes a velocidad máxima y la velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato (Folch, *et.al.*, 2004). Esta etapa es altamente influenciada por la temperatura, la disponibilidad de nitrógeno, oxígeno, aminoácidos y otros nutrientes (Alcázar, 2018). La fase termina cuando los nutrientes se agotan, las condiciones ambientales se modifican o cuando la célula produce metabolitos tóxicos que inhiben su reproducción (Sánchez, 2011).

3) Fase estacionaria. En esta fase la velocidad de crecimiento de la levadura es igual a la velocidad de muerte. Aún ocurren reacciones metabólicas. Una vez que se obtiene la máxima concentración de células, la levadura se acaba la glucosa y la producción de etanol disminuye (Sánchez, 2011). Durante este periodo las levaduras mueren debido a la falta de nutrientes, además del etanol y otras

sustancias producidas durante la fermentación que son tóxicas para las levaduras (Moreno, *et.al.*, 2009). Aunado a esto, la levadura al producir etanol y al aumentar su concentración en el medio, este producto genera la degradación de los esteroides (que son componentes que le otorgan aumento de la rigidez de su membrana, así como una menor permeabilidad), ocasionando de esta manera, una inhibición por etanol (Aguilar, *et.al.*, 2015). Suárez y colegas en 2016 reportaron que el etanol puede actuar como inhibidor de la fermentación a partir de un 8 % (Suárez, *et.al.*, 2016). Además, la interacción levadura-levadura dentro del proceso de fermentación que es conocida como efecto killer, implica la secreción por parte de ciertas cepas de levaduras de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina killer, la cual mata a células denominadas sensibles, que pueden ser del mismo o de diferentes géneros (Nally, *et.al.*, 2005).

4) Fase de muerte. Es la fase en la que el número de muertes es mayor al número de nuevas células formadas. Esta fase continúa hasta que la población disminuye a una pequeña fracción de células resistentes o hasta que todas las células mueren. En esta fase se realiza la respiración mitocondrial, donde el etanol es transformado a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa, y posteriormente, el acetaldehído es transformado a ácido acético por la acetaldehído deshidrogenasa. Todo esto provoca muerte celular programada (Sánchez, 2011). En esta fase la reserva de energía de las células se ha acabado debido a las condiciones de inanición que fueron anteriormente fundamentadas (Folch, *et.al.*, 2004). En el presente trabajo, no se pudo observar esta fase en ambos medios de cultivo, debido a que la técnica de turbidimetría no permite discernir entre células viables o

mueras, ya que todas son partículas que bloquean y reflejan la luz que atraviesa el medio, sean células vivas o muertas (Acebo, *et.al.*, 2012).

Asimismo, en la literatura es común encontrar algunas fases adicionales para caracterizar la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, además de las cuatro fases principales que anteriormente se revisaron. Por ejemplo, Altamirano reportó que pueden caracterizarse seis fases del crecimiento: 1) fase lag, 2) fase de aceleración del crecimiento, 3) fase logarítmica o exponencial, 4) fase de desaceleración del crecimiento, 5) fase estacionaria y 6) fase de muerte (Altamirano, 2013). Haciendo énfasis en las dos fases extras que reporta dicho autor, es decir, en la fase de aceleración del crecimiento; en esta fase las células viables se reproducen hasta alcanzar una tasa máxima de división. Y en la fase de desaceleración del crecimiento; después de que el crecimiento celular alcanza una tasa máxima de crecimiento es seguida por la desaceleración de la tasa de crecimiento y la tasa de división (Altamirano, 2013).

Nosotros decidimos caracterizar las siguientes fases: 1) fase lag, 2) fase logarítmica o exponencial, 3) fase de desaceleración del crecimiento y 4) fase estacionaria. Esto es muy común en la literatura ya que Abonyi y colaboradores en 2019, además de Pereira y colegas en 2009, así como la mayoría de autores, reportaron estas mismas fases de crecimiento. Cabe resaltar que en el presente trabajo, la fase de muerte no se pudo observar por las limitaciones atribuibles a la técnica de turbidimetría.

9.3.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v (pruebas piloto)

En la **Figura 17**, se muestra la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo papa sacarosa al 1 % m/v. Podemos observar la relación de D.O. relativa (U.R.) vs tiempo (h). La fase lag no fue apreciable, la fase exponencial comprende de las 2 a las 8 h, seguida de una fase de desaceleración del crecimiento comprendida entre las 8 y las 48 h. La fase estacionaria comienza a partir de las 48 h y la fase de muerte no se observó por las limitaciones de la técnica. Cabe aclarar que debido a que la presente gráfica no contaba con una buena resolución en la fase lag, no se pudo comparar con lo reportado en la literatura, por lo tanto, se decidió modificar los tiempos de muestreo.

9.3.2 Crecimiento en hidromiel al 5 % v/v (pruebas piloto)

En la **Figura 18**, se reporta la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v. Se observa la relación de D.O. relativa (U.R.) vs tiempo (h). La fase lag no fue apreciable, la fase exponencial comprende de las 2 a las 8 h, a continuación una fase de desaceleración del crecimiento comprendida entre las 8 y las 48 h y una fase estacionaria que comienza a partir de las 48 h. La fase de muerte no se observó por la limitante de la técnica. Debido a que la presente gráfica no contaba con una buena resolución en la fase lag, no se

comparó con lo reportado en la literatura. Por lo anterior se decidió modificar los tiempos de muestreo y obtener gráficas con una mejor resolución en la fase lag.

9.4 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*: Pruebas finales

Considerando que no se observaron cambios apreciables en la D.O. relativa corregida (U.R) después de las 48 h en las **Gráficas 1 y 2**, se decidió interpolar los últimos dos puntos (correspondientes a los tiempos de 72 y 96 h respectivamente), para mejorar la resolución al inicio de la cinética y con esto hacer visible la fase lag en ambas gráficas. El mejorar la resolución de las gráficas es importante ya que con esto podremos conocer, caracterizar y estudiar de forma adecuada las fases que componen la curva de crecimiento de la levadura, así como el cálculo de los parámetros cinéticos que nos brindan información sobre el microorganismo, sustratos y productos de interés. Por ejemplo, Molina y colegas en 2019 mencionan que la cinética microbiana se encarga de entender todas las manifestaciones y reacciones de la vida de los microorganismos: crecimiento, supervivencia, muerte, adaptaciones, formación de producto, ciclos celulares e interacciones con el medio ambiente (Molina, *et.al.*, 2019). En los procesos fermentativos industriales es muy importante estudiar el comportamiento cinético del microorganismo ya que de él depende el rendimiento del producto de interés, entre otras variables. Además, es de suma importancia ya que representa la pérdida o ganancia económica de los procesos (Molina, *et.al.*, 2019).

9.4.1 Crecimiento en caldo papa sacarosa al 1 % m/v (pruebas finales)

En la **Figura 19**, se muestra la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo papa sacarosa al 1 %. Se muestra la relación de D.O. relativa (U.R.) vs tiempo (h). El cultivo de la levadura comienza a crecer en una fase lag que comprende las 2 primeras horas, seguida de una fase logarítmica que comprende de las 2 a las 8 h, posteriormente una fase de desaceleración que consiste de las 8 a 24 h, así como una fase estacionaria de las 24-48 h. La fase de muerte no fue apreciable en los tiempos medidos. Estos resultados se pueden comparar con lo reportado por Abonyi y colegas, ya que dichos autores muestran un comportamiento similar en caldo papa dextrosa al 1% m/v (**Figura 21**) (Abonyi, *et. al.*, 2019).

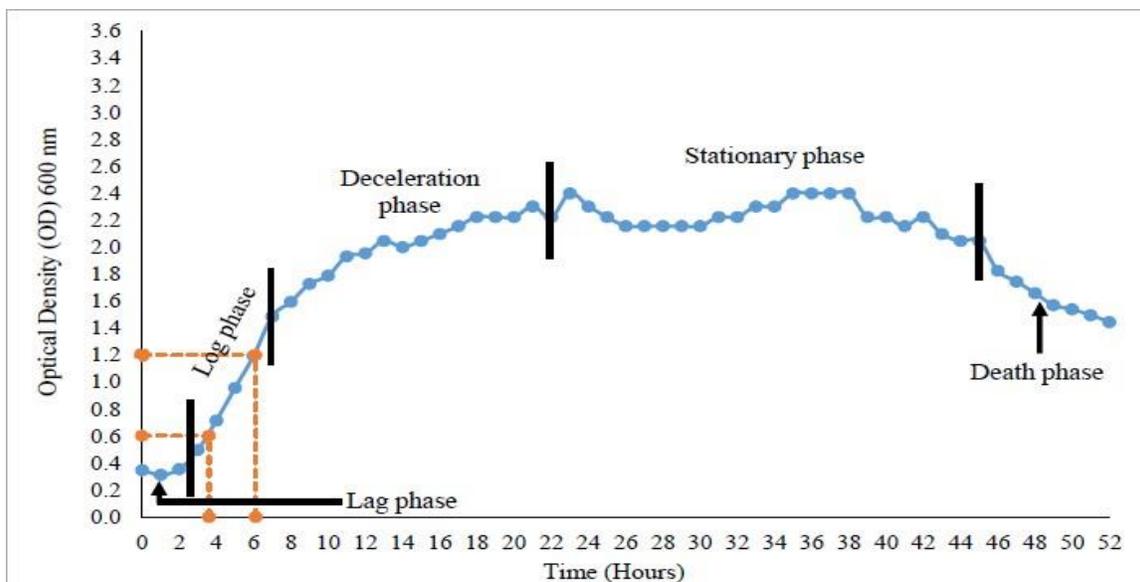


Figura 21. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo papa dextrosa al 1 % m/v. Relación de D.O. relativa (U.R) a 600 nm vs tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 7 determinaciones independientes \pm E.E. (Abonyi, *et. al.*, 2019).

En la **Figura 21** se muestra la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo papa dextrosa al 1 %, reportada por Abonyi y colaboradores. En el gráfico se aprecia la fase lag en las dos primeras horas. Después la fase logarítmica que comprende 2-10 h, seguida de una fase de desaceleración que va de 10-21 h, así como una fase estacionaria: 22-46 h. Finalmente, la fase de muerte: a partir de las 48 h (Abonyi, *et.al.*, 2019). Como podemos notar, la cinética de la levadura es muy similar en ambas gráficas, aunque cabe destacar que *Saccharomyces cerevisiae* alcanzó más rápido la fase estacionaria en el caldo papa dextrosa, ya que es más fácil aprovechar este carbohidrato como sustrato que con respecto al crecimiento de este microorganismo con sacarosa como fuente de carbono.

9.4.2 Crecimiento en Hidromiel al 5 % v/v (pruebas finales)

Los resultados reportados en la **Figura 20** muestran que el cultivo de levaduras entró en una fase lag que corresponde a: 0-3 h, seguida de una fase log que comprende: 3-8 h, además de una fase de desaceleración comprendida en: 8-23 h, luego una fase estacionaria de: 24-48 h y finalmente, la fase de muerte que no fue apreciable en los tiempos medidos.

Estos resultados pueden ser comparados con los reportados por Pereira y colaboradores (**Figura 22**) (Pereira, *et. al.*, 2009).

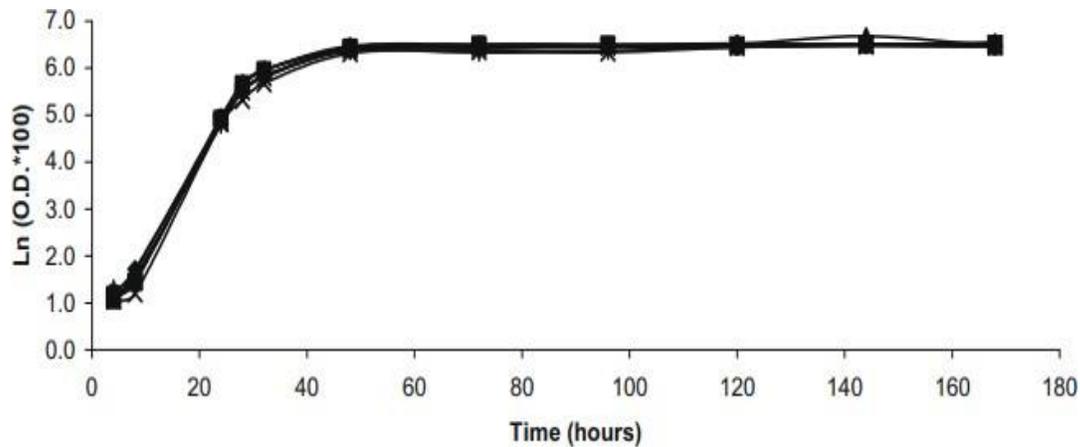


Figura 22. Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v con 20 % m/v extra de glucosa + fructosa. Relación de Ln D.O. relativa a 600 nm (U.R) vs tiempo (h). Cada dato denota el promedio de 7 determinaciones independientes \pm E.E. (Pereira, *et. al.*, 2009).

En este sentido, en la **Figura 22** se reporta la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en hidromiel al 5 % v/v + 20 % m/v de glucosa y fructosa. Estas concentraciones de fuentes de carbono se encuentran varias veces por arriba de las usadas en procesos de fermentación industrial y de laboratorio (Cáceres *et al.*, 2002). Específicamente se observa lo siguiente; fase lag: no es apreciable, fase log: 10-24 h, fase de desaceleración: 24-48 h, fase estacionaria: 48 h en adelante. No se apreció la fase de muerte en los tiempos medidos (Pereira, *et.al.*, 2009). Entonces, la cinética de la levadura es muy similar en ambas gráficas, pero en el caso de los resultados reportados por Pereira y colegas, la fase lag carece de resolución, probablemente debido al estrés osmótico causado por la elevada concentración de glucosa y fructosa usadas en

sus experimentos. Esto podría provocar que a la levadura le lleve más tiempo adaptarse al medio. Recordando que el estrés osmótico puede causar una disminución en la viabilidad celular, afectar la velocidad de fermentación, así como el volumen celular. Asimismo, la fase estacionaria registrada por Pereira y colaboradores se alcanzó posterior a lo reportado en nuestra gráfica experimental, probablemente debido al exceso de sustrato.

Un punto de importancia es recalcar que en el presente trabajo de tesis se logró diseñar y probar un dispositivo portátil capaz de medir el crecimiento de microorganismos con muy pocas variaciones entre los diferentes replicados biológicos llevados a cabo. Por ejemplo, en las **Tablas 1-4** se pueden observar valores del error estándar de la media relativamente pequeños. Según Colón y Abaira y colaboradores, esto es lo adecuado, porque una distribución de medias de muestra que está menos extendida (y que tiene un error estándar pequeño), constituye una mejor estimación de la media de la población que una distribución de medias de muestra que está ampliamente dispersa y que tiene un error estándar más grande (Colón, 2021; Abaira, *et.al.*, 2002). Asimismo, Gempp y colaboradores en 2006 mencionan que un valor de desviación estándar más alto ya su vez un error estándar alto indica una mayor dispersión de los datos. Por ende, se producen intervalos de confianza menos precisos (más amplios) y pruebas estadísticas menos confiables (Gempp, *et.al.*, 2006).

Los resultados obtenidos demuestran que es posible diseñar dispositivos de medición miniaturizados con la ayuda de un teléfono inteligente, software

adecuado y materiales caseros aún en condiciones de trabajo en modalidad remota. De igual manera, este dispositivo tiene el potencial de ser utilizado en prácticas de campo y podría sustituir a un turbidímetro convencional de laboratorio o un turbidímetro portátil del actual mercado, con la ventaja de ser menos costoso y más práctico.

10. Conclusiones

- Se diseñó una app móvil para el sistema operativo Android® (Sensor de Luz) a través de la plataforma MIT App Inventor®.
- Se desarrolló un dispositivo para medir la fermentación de la levadura acoplada a la app móvil.
- Se determinaron los parámetros óptimos de los medios de cultivo y los mejores tiempos de muestreo.
- Se determinó la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* con resultados similares a los reportados en la literatura.

11. Perspectivas

- Actualizar la app para poder exportar los datos del smartphone a la computadora en tiempo real.
- Comparar datos obtenidos mediante este dispositivo vs un turbidímetro convencional y un espectrofotómetro.

- Determinar parámetros cinéticos para un análisis biotecnológico más robusto.

12. Referencias bibliográficas

- Vierna, *et.al.*, (2015). *Medición del crecimiento microbiano*. Protocolos de Prácticas de Microbiología de 1983.
- ISO 7027-1, (2016). *Water Quality. Determination of turbidity*. <https://www.iso.org/standard/62801.html>
- Acebo, *et.al.*, (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Cuba. 44(1). pp. 1-18. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf>
- Vidal, *et.al.*, (2014). Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control. Revista Scientia et Technica Año XIX. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 19(1). pp. 1-5. <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/8897>
- Sandra, *et.al.*, (2006). Diseño y construcción de un instrumento para la medición de glucosa. Revista Ingeniería UC. Venezuela. 13(3). pp. 35-45. <https://www.redalyc.org/pdf/707/70713306.pdf>
- HACH, (2021). *Turbidímetros portátiles*. <https://latam.hach.com/2100q-turbidimetro-portatil-epa/product?id=54617121937>

- Labuschagne, *et.al.*, (2021). Thiamine: a key nutrient for yeasts during wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105 (3). pp. 1.
<https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/s00253-020-11080-2>
- Avissar, *et.al.*, (2013). *Biology*. Cellular Respiration. Glycolysis. 1° Edición. pp. 650-680. OpenStax College.
- Bonifaz, *et.al.*, (2012). *Micología Médica Básica*. Capítulo 15 Levaduras. 4° Edición. pp. 64-65, 75-76, 84-86. McGraw-Hill.
- Sánchez, (2011). Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. pp. 1-105. Tesis para obtener el título de Ingeniero de Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/11360.pdf
- TRADI-PAN®, (2008). *Ficha técnica*. <https://www.tradipan.com.mx/>
- Kooistra, (2018). *Newzoo's 2018 Global Mobile Market Report: Insights into the World's 3 Billion Smartphone Users*.
<https://newzoo.com/insights/articles/newzoos-2018-global-mobile-market-report-insights-into-the-worlds-3-billion-smartphone-users/>
- INEGI, (2021). *Encuesta nacional sobre disponibilidad y uso de tecnologías de la información en los hogares*.
https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/OtrTemEcon/ENDUTIH_2020.pdf
- MIT App Inventor®, (2021). *Create apps*. <https://appinventor.mit.edu/>

- Merck-Millipore, (2021). *Caldo papa dextrosa*.
https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Potato-dextrosemedium.MDA_CHEM-110130
- Archundia, (2014). *Cerveza artesanal elaborada con miel de abeja mexicana*. pp. 14-89. Tesis para obtener el título de Químico en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México.
<http://132.248.9.195/ptd2014/marzo/0709884/Index.html>
- Yuliana®, (2021). *Ficha técnica*.
<https://www.yuliana.com.mx/products/jarra-medidora-natural-650-ml>
- QMOSHEN®, (2021). *Ficha técnica*.
<https://www.fandea.com/bascula-digital-gramera-de-cocina-pesa-de-1-gramo-a-10-kilos.html>
- MAVER®, (2021). *Ficha técnica*. <https://www.maver.com.mx/>
- Python®, (2021). *Create apps*. <https://www.python.org/>
- SlashData®, (2021). *State of the Developer Nation*.
https://developer-economics.cdn.prismic.io/developer-economics/dbf9f36f-a31a-440a-9c22-c599cc235fa4_20th+edition+-+State+of+the+developer+Nation.pdf
- Barboza, *et.al.*, (2010). Láser de alta potencia y eficiencia bombeado por un diodo. *Revista Mexicana de Física*. México. 56(6). pp, 489-496.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmf/v56n6/v56n6a9.pdf>
- Juárez, (2013). *Propuesta de esquemas de excitación usando diodos láser en rojo para láseres de fibra con emisión en UV, Azul e IR*. Tesis para

obtener el grado de Maestría en Ciencias de la carrera de Ingeniería en Física. Centro de Investigaciones en óptica. Guanajuato, México.
<https://cio.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1002/327/1/14293.pdf>

- López, (2006). Estudio de las aplicaciones clínicas del láser de diodo InGaAsP (980 nm) en periodoncia e implantología. Tesis para obtener el grado de Doctorado en la carrera de Cirujano Dentista. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela. Chile.
https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2300/9788497508476_content.pdf?sequence=1
- Kieliszek, *et.al.*, (2016). Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC9950 yeast. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 35(1). pp. 90-96. DOI: [10.1016/j.jtemb.2016.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.01.014)
- Saucedo, *et.al.*, (2020). *Mi primera App. Educación Tecnológica*. pp. 32-36. Equipo Editorial de Materiales y Contenidos Digitales (DGPLED).
https://www.buenosaires.gob.ar/sites/gcaba/files/profnes_ed_tecno_mi_primera_app_0.pdf
- Kelley, *et.al.*, (2014). An affordable open-source turbidimeter. *Sensors Journal*. USA. 14 (4). pp. 7142-7152.
https://www.researchgate.net/publication/261837564_An_Affordable_Open-Source_Turbidimeter
- Metzger, *et.al.*, (2018). Low-cost grin-lens-based nephelometric turbidity sensing in the range of 0.1–1000 ntu. *Sensors Journal*. USA. 18(4). pp.

115-1120.

https://www.researchgate.net/publication/324422533_Low-cost_GRIN-Lens-based_nephelometric_turbidity_sensing_in_the_range_of_01-1000_NTU

- Kirkey, *et.al.*, (2018). Low-cost submersible turbidity sensors using low frequency source light modulation. IEEE Sensors Journal. USA. 18(22). pp. 9151–9162. <https://ieeexplore.ieee.org/document/8457209>
- Gillett, *et.al.*, (2019). A low-cost continuous turbidity monitor. Sensors Journal. USA. 19(14). pp. 3039. https://www.researchgate.net/publication/334385647_A_Low-Cost_Continuous_Turbidity_Monitor
- Sperandio, *et.al.*, (2021). Development of a low-cost portable turbidimeter for processes. Department of Chemical Engineering, State University of Cornell. USA. 18(12). pp. 1-14. <https://arxiv.org/pdf/2106.09491.pdf>
- Sappat, *et.al.*, (2011). Detection of Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter. Journal of Virological Methods. 175(2). pp. 141-148. <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0166093411002114?via%3Dihub>
- Mouser Electronics, (2021). *Sensores y componentes optoelectrónicos*. <https://www.mouser.mx/manufacturer/broadcom/product-line/>
- Hussain, *et.al.*, (2021). Smartphone-based optical spectroscopic platforms for biomedical applications: a review. Biomedical Optics Express.

USA. 12(1). pp. 1974-1998.

https://www.osapublishing.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-12_4-1974&id=4490

- Zhu, *et.al.*, (2012). Quantum dot enabled detection of *Escherichia coli* using a cell phone. *Analyst Journal*. 137(11). pp. 2541– 2544.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22396952/>
- Liang, *et.al.*, (2015). Wireless virtualization for next generation mobile cellular networks. *IEEE Wireless Communications*. USA. 22(1). pp. 61-69.
<https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/7054720>
- Wajih, *et.al.*, (2019). Development of a low-cost and portable smart fluorometer for detecting breast cancer cells. *Biomedical Optics Express*. USA. 10(2). pp. 399–410.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6377908/>
- Wei, *et.al.*, (2013). Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smartphone. *ACS Nano*. 7(10). pp. 9147–9155.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn4037706>
- CONAPA, (2021). *Papa Fresca Mexicana*.
<https://www.conpapa.org.mx/index.php/blog/item/4-descripcion-de-los-principales-componentes-de-la-papa>
- Romero, *et.al.*, (2019). Hidrólisis de sacarosa por invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto. *Revista Acta Agronómica*. Universidad Tecnológica y Pedagógica Palmira. Colombia. 68(2). pp. 115-125.
<http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v68n2/0120-2812-acag-68-02-115.pdf>

- Gobierno de México, (2017). *Hidromiel*.
<https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/hidromiel-la-bebida-de-los-dios>
- NMX-F-036-981, (2006). *MIEL DE ABEJA. ESPECIFICACIONES. NORMA MEXICANA. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS*.
<https://atlasnacionaldelasabejasmx.github.io/atlas/pdfs/NMX-F-036-1981.PD>
- Alcázar, (2018). Capacidades fermentativas y generación de volátiles de cepas de levadura aisladas en diferentes estados productores de mezcal. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la carrera de Ingeniería Química. CIATEJ. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. México.
<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/91/1/Elba%20Montserrat%20Alcazar%20Valle.pdf>
- Molina, *et.al.*, (2005). Evaluación de parámetros cinéticos para la *Saccharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. Revista de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 15(1). pp. 92-102.
[https://www.researchgate.net/publication/280821839_EVALUACION_DE_P
ARAMETROS_CINETICOS_PARA_LA_Sacharomyces_cerevisiae_UTILIZ
ANDO_AGUA_DE_COCO_COMO_SUSTRATO](https://www.researchgate.net/publication/280821839_EVALUACION_DE_PARAMETROS_CINETICOS_PARA_LA_Sacharomyces_cerevisiae_UTILIZANDO_AGUA_DE_COCO_COMO_SUSTRATO)
- Salari, *et.al.*, (2017). Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. Electronic Physician. 9(1). pp. 3592–3597.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308499/>

- Organización Panamericana de la Salud OPS, (2012). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/28456>
- Hurst, *et.al.*, (2007). *Manual of environmental microbiology*. 3° Edición. pp. 925-926. ASM PRESS.
- Gómez, *et.al.*, (2011). Detección de microorganismos potencialmente patógenos en los hogares de Mar del Plata. *Revista Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 45(3). pp. 441-445. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53521520005.pdf>
- Humboldt®, (2021). *Ficha técnica*. http://www.essalud.gob.pe/ietsi/EQUIPAMIENTO_COMPLEMENTARIO/pdf/EC-055.pdf
- Mabe®, (2021). *Ficha técnica*. https://www.iomabe.com.mx/docs/default-source/default-document-library/fc_io7686ss0_mex_2020.pdf?Status=Master&sfvrsn=0
- ISO 17025, (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>
- Madigan, *et.al.*, (2015). *Brock: Biología De Los Microorganismos*. 14° Edición. pp. 800-805. Pearson Education.
- Murray, *et.al.*, (2012). *Microbiología Médica*. 5° Edición. pp. 234-235. Elsevier Mosby.

- Tortora, *et.al.*, (2007). *Introducción a la microbiología*. 9° Edición. pp. 367-368. Editorial Médica Panamericana.
- Santambrosio, *et.al.*, (2009). *Esterilización en el laboratorio*. Cátedra de biotecnología. Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Rosario. Argentina. 35(1). pp. 125-136.
https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoll.pdf
- IUPAC, (2021). *Boiling point of water IUPAC*. <https://iupac.org/>
- Castañeda, *et.al.*, (2016). *Cambios en los puntos de fusión y ebullición del agua debido a la variación en la presión*. 1° Edición. pp. 38-40. SEP.
- Suarez, *et.al.*, (2016). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión Bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Cuba. 50(1). pp. 20-28.
<https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>
- Mateos, *et.al.*, (2007). *Crecimiento microbiano*. Departamento de microbiología y genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. España. <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>
- Gómez, *et.al.*, (2015). Evaluación de harina de soya como fuente primaria en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Agroindustrial Science*. Perú. 5(1). pp. 110-121.
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/933>
- Pérez, *et.al.*, (2011). Evaluación del efecto de diferentes diluciones de agua de coco suplementada con Biotina para la producción de la Levadura

(*Saccharomyces cerevisiae*) a nivel de matraz y en biorreactor de tanque agitado. Tesis para obtener el grado de maestría en Tecnología en Agroindustria. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Veracruz, México.

http://www.itsalamo.edu.mx/investigacion/publicaciones/Saccharomyces_Documento.pdf

- Cáceres, *et.al.*, (2002). Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obtener el título de Ingeniero de producción agroindustrial. Universidad de Bogotá. Colombia. <https://intellectum.unisabana.edu.co/handle/10818/5072>
- Altamirano, (2013). Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/552/1/Altamirano_cc.pdf
- Abonyi, *et.al.*, (2019). Measurement of yeast growth using spectrophotometer. University of Ghana. 23 (1). pp. 2-5. DOI: [10.13140/RG.2.2.15418.03527](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15418.03527)
- Pereira, *et.al.*, (2009). Mead Production. Food and Chemical Toxicology. 47(8). pp. 3-5. [DOI 10.1016/j.fct.2009.05.028](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.028)
- Malairuang, *et.al.*, (2020). High Cell Density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with Intensive Multiple Sequential Batches Together with a Novel

Technique of Fed-Batch at Cell Level (FBC). *Processes*. 8(10). pp. 1321.

<https://www.mdpi.com/2227-9717/8/10/1321/htm>

- Papapetridis, *et.al.*, (2018). Optimizing anaerobic growth rate and fermentation kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing Calvin-cycle enzymes for improved ethanol yield. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 17(11). pp. 1200-1218.
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-1001-z>
- Lainioti, *et.al.*, (2011). The study of effect of fermentation temperature on the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain, in the presence or absence of support, by chromatographic techniques. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 34(3). 195–208. DOI: [10.1080/10826076.2011.546155](https://doi.org/10.1080/10826076.2011.546155)
- Hernández, *et.al.*, (2003). *Microbiología industrial*. 1° Edición. pp. 36- 61. Editorial EUNED.
- Ruiz, *et.al.*, (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista mexicana de ingeniería química*. México. 6(1). pp. 33-40.
<https://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>
- Victores, *et.al.*, (2008). Cultivos semicontinuos como una herramienta para la caracterización celular del hibridoma murino 1E10. *Revista de Biotecnología Aplicada*. Cuba. 25(1). pp. 149-154.
<https://elfosscientiae.ciqb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2008/25/2/BA002502TN1149-154.pdf>

- Dutta, *et.al.*, (2008). *Fundamentals of Biochemical Engineering*. 1° Edición. pp. 50-140. Springer.
- Villadsen, *et.al.*, (2011). *Bioreaction Engineering principles*. 3° Edición. pp. 339-308. Springer.
- Rao, *et.al.*, (2010). *Introduction to biochemical engineering*. 2° Edición. pp. 97-128. McGraw-Hill.
- Castro, *et.al.*, (2020). *Reactores químicos. Curso introductorio*. 1° Edición. pp. 7-30. UNL.
- Linko, *et.al.*, (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*. USA. 65(2). pp. 85-98.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165698001357>
- Vincent, *et.al.*, (2006). *Química industrial orgánica*. 1° Edición. pp. 67-93. Editorial Universidad Politécnica de Valencia.
- Vázquez, *et.al.*, (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Revista de Ingeniería, Investigación y Tecnología*. México. 8(4). pp. 249-259.
- Moreno, *et.al.*, (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. 1° Edición. pp. 200-220. Springer.
- Aguilar, *et.al.*, (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial Science*. Perú. 5(1). pp. 111-122.
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/932>

- Nally, *et.al.*, (2005). Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. Revista Argentina de Microbiología. Argentina. 37(1). pp. 73-77. <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016799002.pdf>
- Folch, *et.al.*, (2004). La respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología. México. 46(1). pp. 24-46. https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1_2d.pdf
- Molina, *et.al.*, (2019). Determinación de la curva de crecimiento microbiano de *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae* en tunta, variedades chuska y negra. Revista de difusión cultural y científica de la Universidad de La Salle. Bolivia. 18(18). pp. 109-119. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-081X2019000200011&lng=pt&nrm=iso
- Abraira, *et.al.*, (2002). Desviación estándar y error estándar. SEMERGEN. Revista Española de medicina de familia. Unidad de bioestadística clínica. España. 28(11). pp. 621-625. <https://www.elsevier.es>
- Colón, (2021). *GeoGebra. Error estándar.* <https://www.geogebra.org/m/w5e9hzhf>
- Gempp, *et.al.*, (2006). El error estándar de medida y la puntuación verdadera de los tests psicológicos: Algunas recomendaciones prácticas. Revista: Terapia Psicológica. Sociedad Chilena de Psicología Clínica. Chile. 24(2). pp. 117-129. <https://www.redalyc.org/pdf/785/78524201.pdf>