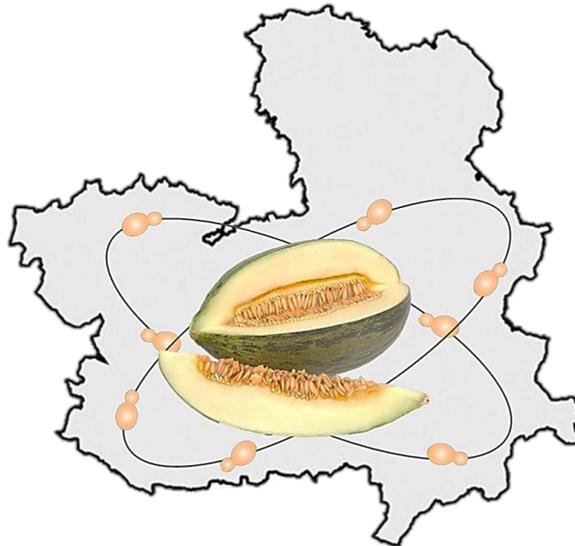


MEMORIA PROYECTO INVESTIGACIÓN APROVECHAMIENTO DE EXCEDENTES DE MELÓN DE LA MANCHA COMO NUEVOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS PRODUCTORAS DE MICOPROTEÍNAS



Investigadoras principales:

Beatriz García-Béjar Bermejo
Profesora Ayudante Doctora

Inés María Ramos Monge
Investigadora Postdoctoral

Departamento Química Analítica y Tecnología de los Alimentos
Universidad de Castilla-La Mancha

Enero 2025

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 1 / 12
	FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26	
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			

1. RESUMEN DEL PROYECTO PLANTEADO

El siguiente informe describe los avances alcanzados en el proyecto de investigación “Aprovechamiento de excedentes de melón de la Mancha como nuevos medios de cultivo para levaduras productoras de micoproteínas” financiado por la Cátedra de Economía Circular de la Universidad de Castilla – La Mancha. Asimismo, se exponen las conclusiones a las que se ha llegado durante el desarrollo del proyecto y las perspectivas futuras han surgido a partir de estos resultados.

En términos generales, el presente proyecto ha abordado el aprovechamiento de excedentes de melón tipo piel de sapo, producidos en la región de La Mancha, los cuales han sido proporcionados por la empresa *Cincofresh* (Cinco Casas, Ciudad Real), colaboradora en este proyecto. Los excedentes han sido procesados por las técnicas pertinentes, obteniendo a partir de su pulpa un medio líquido apto para el crecimiento de levaduras, el cual ha sido caracterizado químicamente. Con el objetivo de optimizar las condiciones más adecuadas para la producción de proteínas por parte de las levaduras, se ajustaron las condiciones del medio en cuanto al pH y la fuente de nitrógeno. La selección del mejor medio a base de pulpa de melón se llevó a cabo evaluando el crecimiento de las células, el consumo de azúcares y la producción de proteínas de una cepa de levadura productora de micoproteínas.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa inicial han permitido introducir modificaciones en el proyecto inicialmente planteado. Se ha propuesto utilizar otras partes del melón para desarrollar nuevos medios de cultivo y maximizar así el aprovechamiento de este recurso. Estos aspectos se describirán con mayor detalle en las secciones siguientes.

2. OBJETIVOS

A continuación, se indican los objetivos específicos actualizados y el punto de cumplimiento desarrollado hasta la fecha:

- 1) Procesar los excedentes de melón para obtener un medio líquido homogeneizado apto para el crecimiento de levaduras.
- 2) Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente el medio obtenido.
- 3) Elaborar y desarrollar un diseño experimental para obtener las condiciones óptimas de crecimiento.
- 4) Estudiar el crecimiento de una cepa de levadura productora de micoproteínas en los diferentes medios propuestos.
- 6) Aplicar las condiciones óptimas obtenidas en la elaboración de otros medios de cultivo utilizando todas las partes del melón ^{NEW} (pepitas y cáscara). (En desarrollo)
- 5) Cuantificar las micoproteínas producidas a partir de la cepa tipo al final del proceso de crecimiento. (En desarrollo)
- 7) Evaluar estadísticamente cuál de todos los medios desarrollados sería el más idóneo para la producción de micoproteínas. (En desarrollo)
- 8) Recopilar resultados y redactar el informe final.

1

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 2 / 12
	FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26	
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			

3. PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS EN BASE A LAS TAREAS PROPUESTAS

a. Tareas relativas al objetivo 1:

Aproximadamente 15 kg de melón utilizados para este proyecto fueron enviados el 26 de julio por la empresa *Cincofresh* a las instalaciones de la UCLM (Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas). Estas piezas fueron seleccionadas por la empresa la cual ha indicado que los melones que no alcanzan un calibre o peso marcado por el mercado son catalogados como excedentes, incluso cumpliendo todas las características de calidad y seguridad alimentaria (Figura 1).

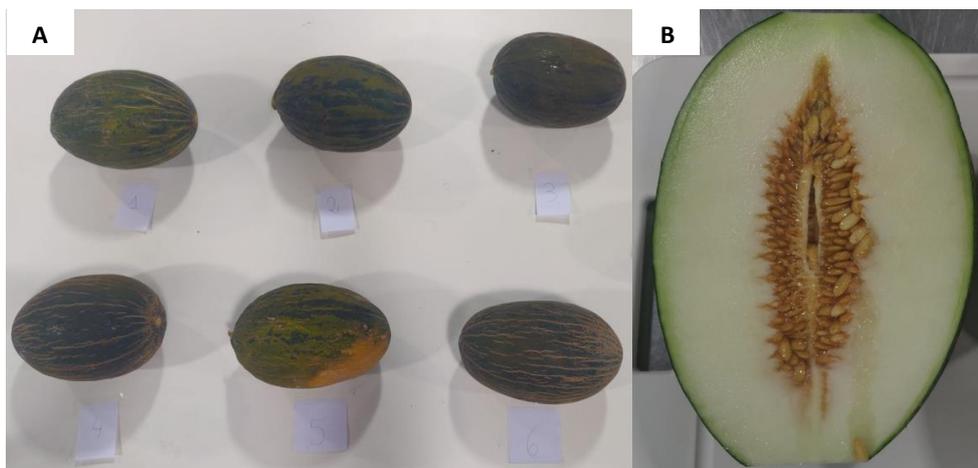


Figura 1. Ejemplo de los excedentes de melón proporcionados por la empresa (A) y corte transversal de una de las piezas (B).

En primer lugar, se llevó a cabo el procesamiento de las piezas, separando cada una de sus partes (pulpa, semillas y corteza) que fueron pesadas y homogeneizadas con una trituradora de alimentos (Cecotec Power 2000MAX Mix Go). Una vez obtenidos los homogeneizados, estos se congelaron a una temperatura de -20°C para su posterior uso. Así mismo, se realizó el cálculo del rendimiento del proceso de obtención del medio a base de melón puesto que el primer medio propuesto estaba elaborado únicamente a base de su pulpa. No obstante, en la Tabla 1 se puede observar el rendimiento del medio a base de melón dependiendo de las partes utilizadas para su obtención.

Tabla 1. Rendimientos del medio a base de melón (media \pm ds) dependiendo de la parte.

Partes utilizadas	Rendimiento (%)
Pulpa	$74,5 \pm 3,8$
Pulpa + pepitas	$81,5 \pm 2,6$
Pulpa + corteza	$93,0 \pm 1,3$
Pulpa + pepitas + corteza	$100,0 \pm 0,0$

2

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 3 / 12
	FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26	
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			

Como se puede observar, incluso si solo se utilizase la pulpa para el desarrollo del cultivo, el aprovechamiento medio de una pieza de melón sería de casi el 75%.

b. Tareas relativas al objetivo 2:

Se realizó la caracterización fisicoquímica de la pulpa homogeneizada siguiendo los métodos oficiales establecidos para alimentos con el objetivo de conocer si se trataba de un sustrato adecuado para el crecimiento microbiano. En la Tabla 2 se muestra el resultado obtenido en el análisis de los principales parámetros fisicoquímicos.

Tabla 2. Composición fisicoquímica de la pulpa de melón (n=2)

pH		Extracto seco (%)		Acidez titulable (g ácido/mL)	Proteína (%)		Fibra (%)		Pectina (%)		
5,6	0,0	10,2	0,0	0,1	1,1	0,0	1,1	0,0	1,0	0,0	
0 ±	1	4 ±	2	1,42 ±	3	2 ±	5	0 ±	3	2 ±	5

El pH medio del homogeneizado de melón es ligeramente ácido, siendo unas condiciones idóneas para el desarrollo de levaduras. Es un medio con un alto contenido de humedad mientras que posee baja concentración de polisacáridos (fibra y pectina) y proteína. Respecto a esta última, su baja concentración puede ser un factor limitante a la hora de la formación de proteínas por parte de las levaduras debido a que es la única fuente de nitrógeno del melón.

Por otro lado, se cuantificaron los azúcares libres de este homogeneizado debido a que son la fuente de carbono de más fácil asimilación que utilizan las levaduras para crecer. En este caso, y al tratarse de una fruta, el análisis se ha centrado en los monosacáridos glucosa y fructosa y el disacárido sacarosa (Tabla 3).

Tabla 3. Azúcares libres presentes en el medio a base de pulpa de melón (n=2)

Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
28,50 ± 3,02	31,07 ± 8,12	2,47 ± 1,15

La fructosa es el azúcar que se encuentra en mayor concentración, seguido de la glucosa, mientras que el contenido de sacarosa no supera los 2,5 g/L de homogeneizado. Se trata de una composición adecuada para el crecimiento de levaduras, ya que la fructosa y la glucosa son azúcares fácilmente metabolizables por estos microorganismos, proporcionando una fuente rápida y eficiente de energía.

Análisis perfil aminoácidos: debido a la baja concentración de proteínas en el medio, se ha decidido llevar a cabo un análisis exhaustivo del perfil de aminoácidos únicamente del

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 4 / 12
FIRMADO POR			FECHA FIRMA
GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ			22-01-2025 15:42:26
RAMOS MONGE INES MARIA			22-01-2025 17:56:35
 F7FBX0eZFd			

medio de cultivo que presente los mejores resultados al concluir el estudio de todas las alternativas descritas en el apartado correspondiente a las Tareas del objetivo 5.

Uno de los factores principales a controlar en un medio de cultivo artificial es comprobar la ausencia de microorganismos contaminantes, puesto que impedirían el correcto crecimiento del microorganismo de interés además de hacer que los resultados no fueran representativos. Por ello se llevó a cabo un tratamiento térmico suave del medio (100°C/5 min) y se analizó la carga microbiana (recuentos totales de bacterias y hongos) antes y después del tratamiento con el objetivo de conocer su efectividad (Fig. 2).

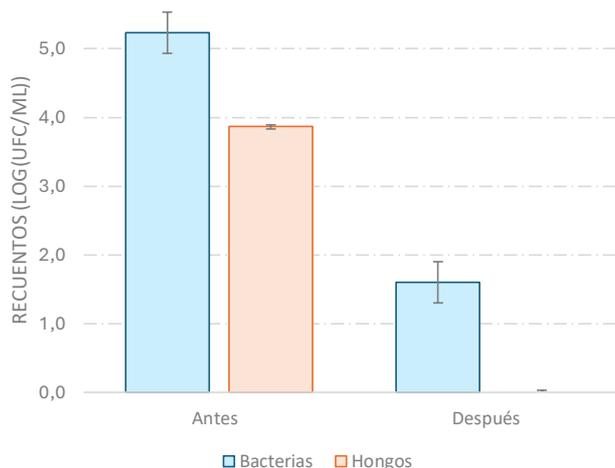


Figura 2. Recuento de bacterias y hongos totales en placa antes y después del tratamiento térmico.

Se puede observar como la pulpa de melón homogeneizada tiene presencia tanto de bacterias como de hongos, en este caso solo se observaron colonias de levaduras habiendo ausencia de mohos. Cabe destacar también que los recuentos iniciales de bacterias eran casi el doble que los de levaduras y que, tras el tratamiento de pasteurización el porcentaje de reducción de bacterias y levaduras fueron del 69,4% y del 100%, respectivamente. Por ello, se consideró que el tratamiento era suficientemente efectivo para evitar el desarrollo de los microorganismos autóctonos del melón además de no ser muy agresivo para los macro y micronutrientes termosensibles del sustrato.

c. Tareas relativas al objetivo 3:

Una vez analizado químicamente el homogeneizado de melón se planteó una optimización del medio en base a dos parámetros fundamentales que podrían mejorar el crecimiento y producción de proteínas de la levadura de estudio como son el pH y la fuente de nitrógeno. Para ello se realizó una matriz experimental basada en el diseño Box-Behnken

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 5 / 12
FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA	
GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26		
RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35		
 F7FBX0eZFd			

en el que se estimaron las interacciones posibles. Para cada factor, pH o fuente de nitrógeno, se establecieron tres niveles y dos replicas para cada uno (Tabla 4).

Tabla 4. Matriz de diseño Box-Behnken codificada con dos factores (X1 = pH; X2 = fuente de nitrógeno) cada una con tres niveles y dos replicas.

N	X1	X2	X1X2
1	-1	-1	1
2	0	-1	0
3	1	-1	-1
4	-1	0	0
5	0	0	0
6	1	0	0
7	-1	1	-1
8	0	1	0
9	1	1	1

Dónde	X1	X2
-1	Sin modificar	Sin añadir nitrógeno
0	Ácido (4,5)	Fosfato monoamónico
1	Básico (8)	Peptona

En base a esta matriz se establecieron 9 medios diferentes en los que se ajustaron los valores de pH (ácido, básico o sin modificar) así como se añadieron sales de nitrógeno inorgánico (Fosfato monoamónico – 0,9%) o nitrógeno orgánico (peptona – 0,9%), en el caso que fuera necesario. En la Figura 3 se muestra un ejemplo del aspecto de los medios de cultivo obtenidos tras el ajuste de los parámetros de optimización y el tratamiento térmico.



Figura 3. Medio de cultivo a base de melón.

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 6 / 12
FIRMADO POR	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 15:42:26	
		22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			

d. Tareas relativas al objetivo 4:

Para comprobar la idoneidad de este medio elaborado para el crecimiento de levaduras y la producción de micoproteínas se utilizó una cepa de la colección de levaduras de la UCLM que había demostrado una buena capacidad de producción de micoproteínas en medio de cultivo artificial (ej. Caldo malta). La cepa de la especie *Pichia manshurica* se encontraba previamente criogenizada (-80°C) para su conservación por lo que se realizó una etapa de recuperación y revitalización de esta (Fig. 4).

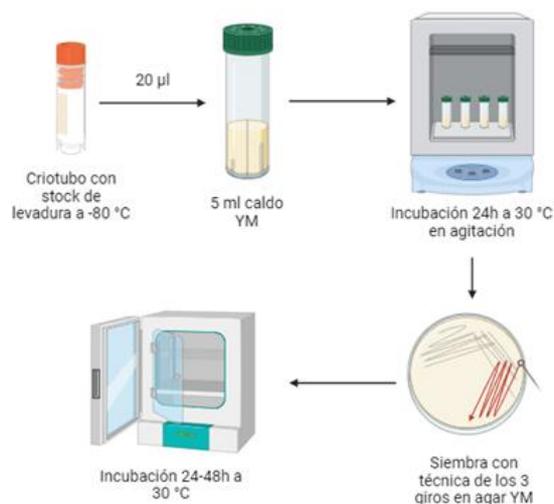


Figura 4. Esquema seguido para la recuperación de la cepa utilizada en el estudio.

Una vez recuperada la cepa se preparó un precultivo con esta en caldo malta y se incubó a 30°C durante toda la noche. Esto permitió obtener un cultivo joven y activo para ser inoculado en cada uno de los medios a base de melón preparados. Con ayuda de una cámara de Thoma, se recontó la población de células del precultivo y se ajustó la concentración de células de partida a 10⁶ cel/mL. Antes de inocular las células, se centrifugaron y se lavaron 2 veces con solución salina (0,9%) para evitar la transferencia cualquier compuesto del precultivo al medio de melón. Una vez inoculado cada matraz y su replicado biológico, se incubaron durante 24h a 30°C con agitación (120 rpm), tomándose una alícuota de 1 mL desde el comienzo de la incubación hasta el final cada 2 horas con el objetivo de realizar el seguimiento del crecimiento de la levadura. Como se ha indicado anteriormente, el seguimiento se realizó de forma directa (recuento microorganismos) y de forma indirecta (cuantificación proteínas y consumo glucosa/fructosa).

Las curvas de crecimiento y producción de proteína a lo largo de las 24 horas se encuentran representadas en las Figuras 5 y 6, respectivamente.

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 7 / 12
FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA	
GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26		
RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35		
<p>F7FBX0eZFd</p>			

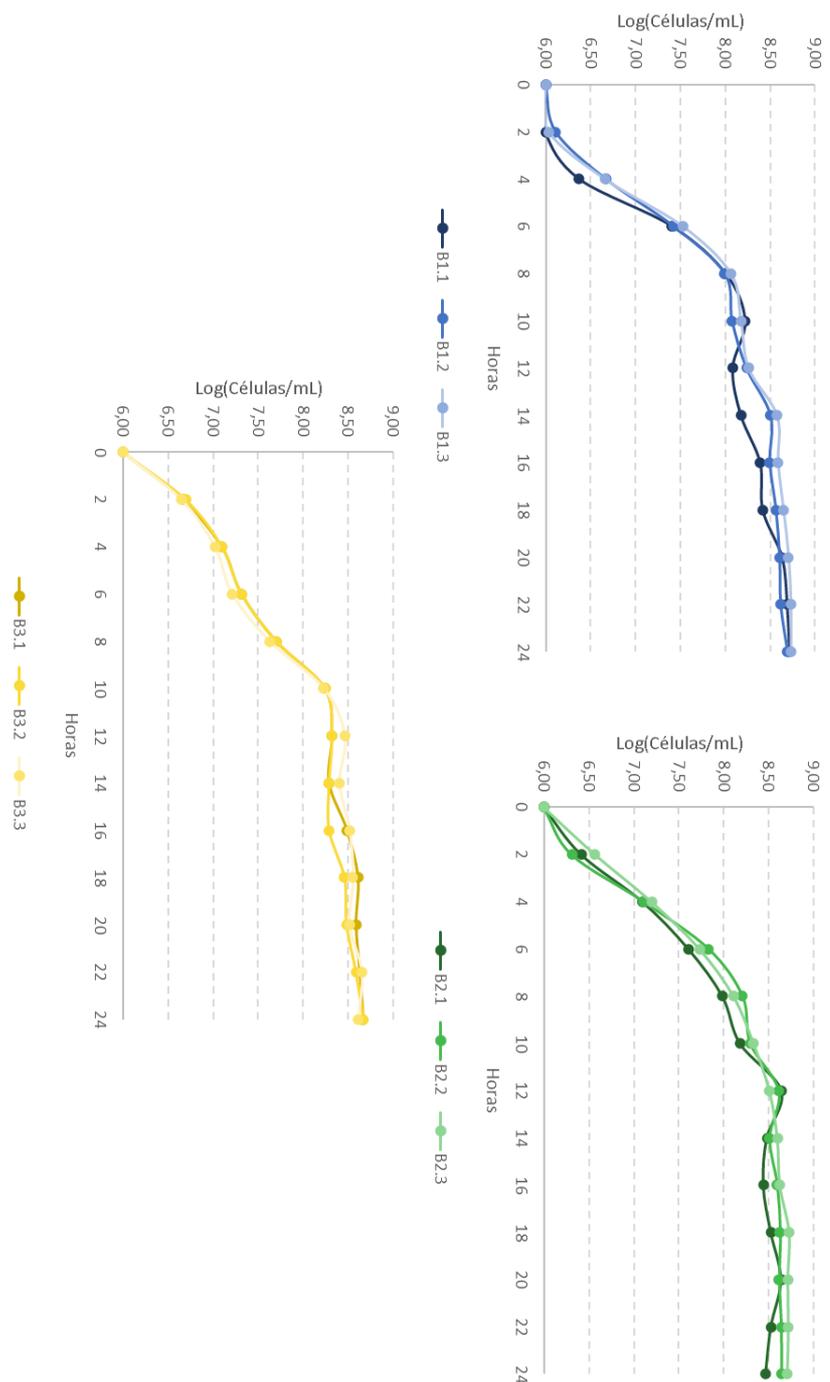


Figura 5. Seguimiento del crecimiento de la cepa durante 24 horas mediante recuentos (células/mL). (B1.1 – medio sin modificar; B1.2 – pH sin modificar + N₂ inorgánico; B1.3 – pH sin modificar + N₂ orgánico; B2.1 – pH ácido sin añadir N₂; B2.2 – pH ácido + N₂ inorgánico; B2.3 – pH ácido + N₂ orgánico; B3.1 – pH básico sin añadir N₂; B3.2 – pH básico + N₂ inorgánico; B3.3 – pH básico + N₂ orgánico).

7

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 8 / 12
FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA	
GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26		
RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35		
 F7FBX0eZFd			

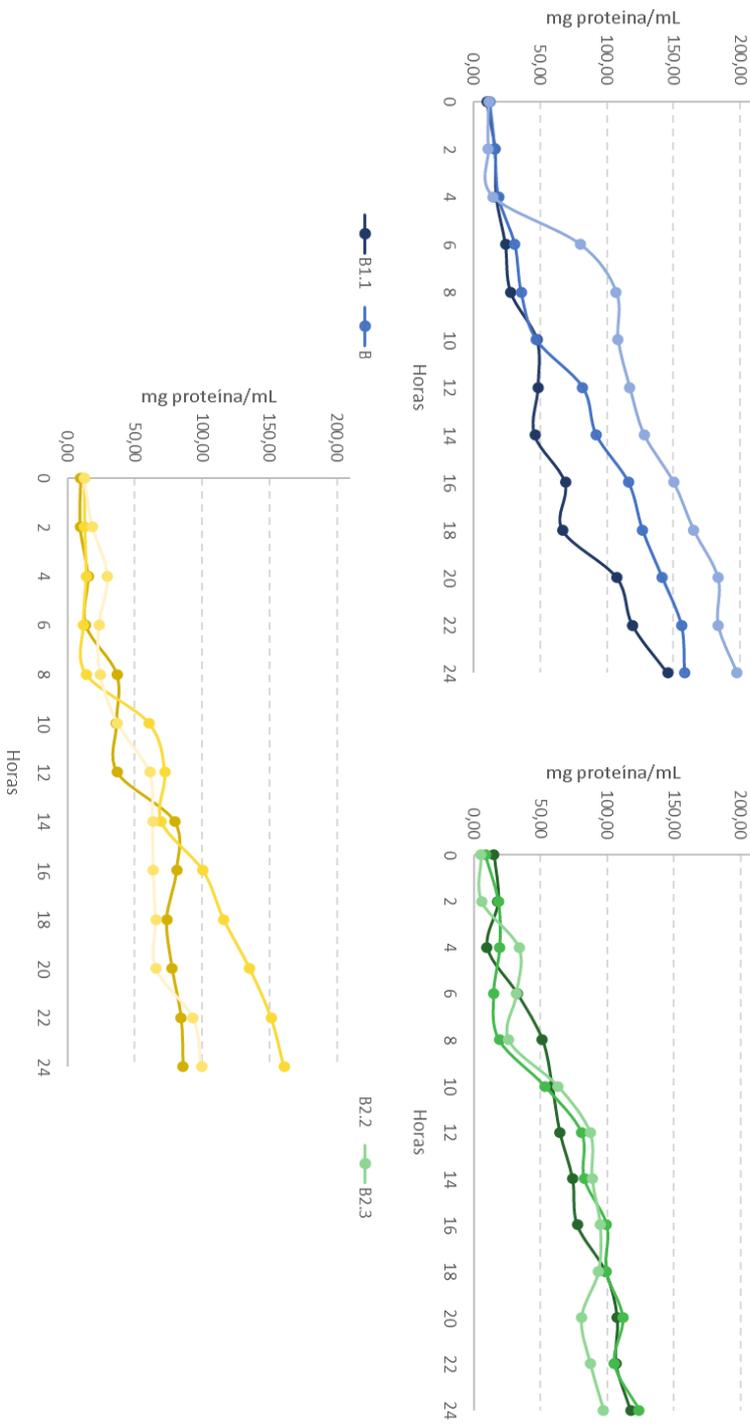


Figura 6. Seguimiento de la producción de proteínas de la cepa durante 24 horas (mg proteínas/mL). (B1.1 – medio sin modificar; B1.2 – pH sin modificar + N₂ inorgánico; B1.3 – pH sin modificar + N₂ orgánico; B2.1 – pH ácido sin añadir N₂; B2.2 – pH ácido + N₂ inorgánico; B2.3 – pH ácido + N₂ orgánico; B3.1 – pH básico sin añadir N₂; B3.2 – pH básico + N₂ inorgánico; B3.3 – pH básico + N₂ orgánico).

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 9 / 12
FIRMADO POR	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	FECHA FIRMA	22-01-2025 15:42:26
	RAMOS MONGE INES MARIA		22-01-2025 17:56:35
 F7FBX0eZFd			

En términos generales el crecimiento de la levadura en los 9 medios ha sido similar, observándose unos recuentos finales entre 8,5 y 8,7 Log(cel/mL), siendo el medio sin ajustar el pH y con peptona (B1.3) en el que se ha encontrado el valor máximo. No obstante, sí que se contemplan diferencias entre la micoproteína producida por la levadura en los diferentes medios. En este caso, es interesante destacar que, en aquellos medios en los que el pH natural del melón no se ha modificado (B1.1, B1.2 y B1.3), se han obtenido alguna de las mayores concentraciones de proteína, a excepción del medio B3.2 (pH básico + N₂ inorgánico). Cabe destacar que las condiciones en las que se alcanza la mayor concentración de micoproteínas (197,73 mg proteína/mL) son las mismas en las que se ha encontrado el mayor valor de recuentos (B1.3).

Por otro lado, las medidas del consumo de glucosa y fructosa para determinar el crecimiento de la levadura no han sido muy adecuados en este caso puesto, en todos los medios, a partir de las 14h y las 16h la levadura había consumido completamente la glucosa y fructosa respectivamente. Descartándose este método para futuros seguimientos.

e. Tareas relativas al objetivo 5:

Gracias a las tareas del objetivo anterior se estableció que las condiciones óptimas para el crecimiento y producción de micoproteínas eran aquellas en las que se mantenía el pH original del melón (pH=5,6) y que se añadía peptona (0,9%), puesto que el crecimiento de la levadura fue adecuado y se consiguieron las máximas concentraciones de proteínas. No obstante, este medio utilizaba únicamente la pulpa del melón, siendo lo más idóneo el uso de más partes de este producto para aprovecharlo lo máximo posible. Por ello se decidió realizar medios optimizados que incorporasen las pepitas y la corteza del melón (Tabla 5).

Tabla 5. Código y composición establecidos para los medios optimizados.

Código medio	Composición
LM	Pulpa
LP	Pulpa + pepitas
LC	Pulpa + corteza
LPC	Pulpa + pepitas + corteza

Se realizaron de la misma manera que el medio hecho solo a base de pulpa y fueron sometidos a las mismas condiciones de tratamiento térmico, encontrándose una reducción de la carga microbiana similar. Un ejemplo del aspecto de los medios tras estos procesos se puede observar en la Figura 7.

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 10 / 12
	FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26	
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			



Figura 7. Aspecto de los medios optimizados. De derecha a izquierda: LM, LP, LC y LPC.

f. Tareas relativas al objetivo 6:

Pendientes de ser desarrolladas una vez que se haya terminado de analizar los resultados obtenidos de los medios optimizados.

g. Tareas relativas al objetivo 7:

Se ha realizado una búsqueda preliminar sobre estudios científicos publicados que abordan el uso de subproductos o excedentes hortofrutícolas para la producción de nuevos ingredientes como las micoproteínas. A modo de resumen y comparando con lo abordado en este proyecto, se ha llegado a las siguientes conclusiones.

El uso de excedentes de melón como medio para la producción de micoproteínas ofrece múltiples ventajas frente al empleo de subproductos hortícolas como, por ejemplo, cáscaras de frutas. En primer lugar, el perfil nutricional del melón, que incluye más concentración de azúcares y menos proporción de fibra, contribuye a un mayor crecimiento, superando los resultados obtenidos con subproductos de frutas. Así mismo, la suplementación requerida por este medio es menor que la necesaria para subproductos en los que hay más déficit de macronutrientes, aunque siempre que se utilicen frutas para elaborar medios para producción de micoproteínas es necesaria la suplementación de una fuente de nitrógeno.

Desde una perspectiva de cumplimiento normativo, los excedentes de melón, al ser considerados aún alimentos y no residuos, se ajustan mejor a las normativas de seguridad, reduciendo los riesgos de contaminación y la necesidad de procesamiento adicional. Esto no solo simplifica el proceso de producción, sino que también potencialmente disminuye los costos asociados al tratamiento de subproductos.

En conclusión, el medio a base de melón es una opción más adecuada para la producción de micoproteínas, debido a su mayor rendimiento, procesamiento más sencillo y ventajas regulatorias, aunque deben considerarse las posibles limitaciones en disponibilidad estacional y costos.

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 11 / 12
	FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26	
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Actualmente, las tareas relacionadas con el nuevo objetivo 5 se encuentran en desarrollo, ya que aún es necesario analizar los datos obtenidos del seguimiento (crecimiento celular y producción de proteínas) y realizar su análisis estadístico. Esto permitirá determinar cuál de los medios optimizados a base de melón es el más adecuado para su uso como medio de cultivo en la producción de micoproteínas. En este contexto, las actividades correspondientes a los objetivos 6 y 7, que dependen de estos resultados previos, también están en proceso de desarrollo.

Una vez completadas todas las tareas y analizados los datos, se planea publicarlos en una revista de alto impacto en el área de Tecnología de los Alimentos o Biotecnología. Asimismo, está prevista la participación en un congreso nacional para presentar los resultados del proyecto, preferiblemente a través de una presentación oral. Tras la publicación de los datos, se procederá a su difusión en redes sociales (BlueSky e Instagram) y en eventos de divulgación científica. Paralelamente, se avanza en el desarrollo de un blog mediante la herramienta Google Sites, que tendrá como propósito principal la divulgación de los resultados obtenidos.

Respecto a la transferencia a la industria, se llevó a cabo una reunión el 27 de septiembre 2024 con el responsable de *Cincofresh* para indicarle la planificación del proyecto. Se ha planificado una reunión final con la empresa para presentarles los datos obtenidos y su difusión dada en los diferentes medios ya comentados.

ID. DOCUMENTO	F7FBX0eZFd		Página: 12 / 12
	FIRMADO POR	FECHA FIRMA	ID. FIRMA
	GARCIA BEJAR BERMEJO BEATRIZ	22-01-2025 15:42:26	
	RAMOS MONGE INES MARIA	22-01-2025 17:56:35	
 F7FBX0eZFd			