

**Aislamiento, identificación y evaluación de  
dos cepas de levaduras capaces de producir  
etanol a partir de lactosuero**

**Guadalupe Alexandra Silva Campusmana  
Franklin David Bonilla Torres**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras  
Octubre, 2014**

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Aislamiento, identificación y evaluación de dos cepas de levaduras capaces de producir etanol a partir de lactosuero**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Guadalupe Alexandra Silva Campusmana  
Franklin David Bonilla Torres**

**Zamorano, Honduras**

Octubre, 2014

# **Aislamiento, identificación y evaluación de dos cepas de levaduras capaces de producir etanol a partir de lactosuero**

Presentado por:

Guadalupe Alexandra Silva Campusmana  
Franklin David Bonilla Torres

Aprobado:

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de Agroindustria  
Alimentaria

---

Mayra Márquez González, Ph.D.  
Asesora

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## Aislamiento, identificación y evaluación de dos cepas de levaduras capaces de producir etanol a partir de lactosuero

Guadalupe Alexandra Silva Campusmana  
Franklin David Bonilla Torres

**Resumen.** El lactosuero es una fuente de contaminación para el ambiente, reflejado en términos de demanda química y biológica de oxígeno (DQO y DBO) cuyas cifras son de 50 y 80 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad fermentativa de levaduras aisladas a base de una bebida alcohólica tradicional, para la producción de bioetanol a base de suero. Las levaduras utilizadas en el experimento fueron identificadas por API 20C AUX como L1: *Candida pelliculosa*, L2: *Saccharomyces cerevisiae* 2 y LC: *Saccharomyces cerevisiae* 1. En la primera fase se cuantificó la producción de etanol de tres cepas. Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3 × 2, utilizando tres cepas de levaduras y dos pH (4.5 y 5) para un total de seis tratamientos y tres repeticiones. En la segunda fase se seleccionó la cepa de levadura que obtuvo la mayor media de producción de etanol (L1) que resultó en 0.103 g/kg. En la realización de la curva cinética para L1 pH 4.5 se determinaron los parámetros cinéticos hasta la sexta hora. La mayor tasa de crecimiento fue 0.247 h<sup>-1</sup> que coincidió con el mayor rendimiento de 0.044 g etanol/g lactosa en el intervalo de 0-2 horas. *Candida pelliculosa* consumió lactosa y produjo etanol con bajos rendimiento debido a que enfocó la energía producida en su crecimiento celular.

**Palabras clave:** Fermentación, lactosa, parámetros cinéticos.

**Abstract:** Whey is a source of contamination to the environment, reflected in terms of chemical and biological oxygen demand (COD and BOD) whose figures are 50 and 80 g L<sup>-1</sup>, respectively. The objective of this study was to determine the fermentative capacity of yeast isolates based on a traditional alcoholic beverage for the production of bioethanol from whey. The yeasts used in the experiment were identified by API 20C AUX such as L1: *Candida pelliculosa*, L2: *Saccharomyces cerevisiae* 2 y LC: *Saccharomyces cerevisiae* 1. In the first phase the ethanol production of three strains was quantified. A completely randomized design (CRD) with factorial arrangement of 3 × 2 was established, using three yeast strains and two pH giving a total of six treatments and three repetitions. In the second phase the yeast strain with the highest average yield of ethanol (L1) was selected which resulted in 0.103 g/kg. In the construction of the kinetic curve for L1 pH 4.5 the kinetic parameters were determined through the sixth hour. The highest growth rate was 0.247 h<sup>-1</sup> which coincided with the highest yield of 0.044 g ethanol/g lactose in the range of 0-2 hours. *Candida pelliculosa* consumed lactose, and produced ethanol with low performance because it focused the energy produced in cell growth.

**Keywords:** Fermentation, kinetic parameters, lactose.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>19</b>
<b>5 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>21</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>25</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de los tratamientos de la fase uno. ....	8
2. Descripción de los tratamientos para la prueba de consumo. ....	9
3. Identificación de tres cepas de levaduras por medio del API 20C AUX .....	11
4. Composición del suero dulce de queso crema. ....	11
5. Producción de etanol de tres cepas de levaduras aisladas. ....	12
6. Cuantificación de etanol, lactosa, pH y crecimiento utilizando <i>C. pelliculosa</i> a pH de 4.5 en medio enriquecido y suero para la prueba de consumo. ....	16
7. Parámetros cinéticos para <i>C. pelliculosa</i> en suero con pH inicial de 4.5. ....	17
8. Parámetros cinéticos para <i>C. pelliculosa</i> en YPL <sup>¶</sup> con pH inicial de 4.5. ....	18

Figuras	Página
1. Relación entre el consumo de lactosa y producción de etanol durante 48 horas de fermentación de <i>C. pelliculosa</i> pH 4.5 en suero. ....	13
2. Relación entre el consumo de lactosa y crecimiento celular durante 48 horas de fermentación de <i>C. pelliculosa</i> pH 4.5 en suero. ....	14
3. Relación entre el crecimiento celular y el pH durante 48 horas de fermentación de <i>C. pelliculosa</i> en suero. ....	15

Anexos	Página
1. Cromatograma para tiempo de elución de metanol y etanol. ....	25
2. Cromatograma para tiempo de elución de lactosa. ....	26
3. Cromatograma para tiempo de elución de galactosa. ....	26
4. Cromatograma para tiempo de elución glucosa. ....	27
5. Cromatograma donde se indica el cambio del tiempo de elución de la lactosa. ....	27
6. Curva de calibración del método de etanol cuantificado por GC. ....	27
7. Cuantificación de lactosa de las dos curvas de cinética de crecimiento. ....	28
8. Cuantificación de etanol de las dos curvas de cinética de crecimiento. ....	29

## 1. INTRODUCCIÓN

El suero lácteo es la fracción de leche que no logra precipitarse por la acción de las enzimas y ácidos, formándose durante la coagulación de la caseína en el procesamiento de la industria láctea (Terán *et al.* s.f.). Contiene lactosa, proteína cruda, lípidos, minerales y vitaminas. Debido a su alto contenido nutricional, representa un gran potencial para obtener otros productos a base de este desecho (Miranda *et al.* 2009).

El suero representa una fuente de contaminación para el ambiente, debido a la carga orgánica reflejada en términos de demanda biológica y química de oxígeno (DBO y DQO) cuyas cifras son de 50 y 80 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Asimismo la enorme producción mundial se debe a que por cada 100 litros de leche procesada para productos lácteos se generan 90 litros de lactosuero (Owais y Zafar 2006).

En la Planta de Lácteos de Zamorano se producen 8000 L de suero dulce a la semana, el cual se desecha en su totalidad (Merizalde e Intriago 2013). De esta manera se visualiza una alternativa para el aprovechamiento de esta fuente de materia orgánica, como la elaboración de otros productos alimenticios y en la generación de fuentes de energía. La producción de etanol a base de lactosa presente en el suero es una alternativa para la utilización de este subproducto industrial (Bley *et al.* 2010).

El etanol se puede producir por rutas químicas (hidratación catalítica del etileno) y biotecnológicas (fermentación). Mediante esta última se hace uso de la capacidad de los microorganismos para la producción de etanol sobre sustratos baratos y disponibles; como lactosa, xilosa y almidón. A través de procesos biotecnológicos se busca producir etanol a partir de desechos orgánicos como el suero de leche, el cual se genera como un residuo en procesos lácteos (Treván 1990).

Las levaduras son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos carbonatados, presentes en medios ricos en azúcares simples. De igual manera existen levaduras capaces de desdoblar azúcares compuestos (Leveau y Bouix 2000). Microorganismos capaces de fermentar lactosa son *Kluveromyces marxianus* (antes conocida como *Kluyveromyces fragilis*), *Kluyveromyces lactis* y *Candida kefir* (antes conocida como *Candida pseudotropicalis*) (García *et al.* 1993).

La fermentación se ve influenciada por diversos factores como la temperatura, el pH, la concentración de azúcares disponibles en el medio y variables externas que influyen en el crecimiento de las levaduras.

La temperatura óptima para la formación de etanol se encuentra entre 32 a 35 °C; en un medio donde se encuentre el pH entre 4 y 5, debido a que esto favorece al crecimiento y el trabajo de la levadura (Navarro *et al.* 1986).

La producción de etanol a base de suero, presenta resultados óptimos. Este proceso fermentativo origina un rendimiento de etanol en un rango de 75-85% del valor teórico, partiendo que por cada 0.538 kg de etanol se necesita de 1 kg de lactosa metabolizada, esto refleja la importancia en la producción de etanol a base de lactosuero (Parra 2009).

En los procesos fermentativos es deseable maximizar la producción de un metabolito de interés; esto no es tarea sencilla de lograr, dado que la fermentación es afectada por factores ambientales, fisicoquímicos, biológicos o por la carencia de un adecuado conocimiento del proceso (Volesky *et al.* 1992). La evaluación de la cinética de crecimiento de células, constituye un aspecto fundamental en el diseño, operación, simulación y predicción de reactores biológicos. Un modelo cinético consta de un conjunto de ecuaciones diferenciales que representan el consumo de sustrato, producción de etanol y la producción de biomasa. El modelo de Monod, uno de los modelos empleados con mayor frecuencia relaciona el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad específica de formación de biomasa (Duarte s.f.).

En un estudio donde se determinó la producción de etanol, se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1288 para la realización de una curva cinética en la producción de etanol y biomasa utilizando como sustrato suero crudo. La levadura utilizada fue capaz de metabolizar lactosa dentro de las 22 horas de fermentación mostrando una producción de 2.1 g/L etanol y 8.8 g/L biomasa (Owais y Zafar 2006).

En investigaciones similares se utilizó el género *Candida* para la conversión de lactosa y producción de etanol. Se seleccionó *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 entre nueve cepas de levadura de fermentación de lactosa para la producción de etanol a partir de suero de queso (Ghaly y Taeweel 1995).

El presente estudio se centró en los siguientes objetivos:

- Aislar y caracterizar a nivel taxonómico dos levaduras fermentadoras de lactosa y tolerantes a etanol.
- Cuantificar la producción de etanol de dos levaduras fermentadoras de lactosa y tolerantes a etanol.
- Realizar una curva cinética de la levadura que produjo mayor cantidad de etanol para obtener los parámetros cinéticos como tasa de crecimiento, rendimiento del sustrato, rendimiento de etanol y tasa de velocidad de consumo del sustrato.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización del estudio.** La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) y en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), ambos ubicados en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Francisco Morazán, Honduras.

### **Fase uno. Aislamiento y cuantificación de etanol producido.**

**Siembra y aislamiento de levaduras.** Se utilizó una bebida alcohólica artesanal conocida coloquialmente como chicha, la cual contenía 7% de etanol. A esta bebida se le realizaron diluciones seriadas ( $10^0$  hasta  $10^{-6}$ ) empleando agua peptonada al 0.1% (p/v). Se sembró cada dilución en platos Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) acidificado a un pH de 4.5, los cuales se incubaron a 24 °C durante cinco días.

Se seleccionaron cinco colonias, caracterizándolas microscópica y macroscópicamente, realizándose un primer aislamiento de las cinco colonias de levaduras por medio de la técnica del estriado en placa con APD acidificado; durante cinco días a 24 °C.

**Prueba de resistencia a etanol y prueba de lactosa.** A las cinco colonias seleccionadas se le hicieron dos pruebas selectivas para evaluar sus capacidades de resistencia a etanol y fermentación de lactosa.

La prueba de resistencia a etanol consistió en someter las cinco colonias de levaduras a concentraciones de 0, 3, 6, 9, 12 y 15% alcohol etílico, en APD acidificado. Se dividieron los platos Petri en cuatro cuadrantes, realizándose estriado en placa en cada uno de ellos con las concentraciones indicadas, incubándose los platos tres días a 24 °C.

Se observó el crecimiento de tres colonias de levaduras hasta 15% de concentración de alcohol. Se descartaron dos colonias de levaduras que no lograron crecer hasta la máxima concentración evaluada.

A las tres levaduras se les hizo la prueba de fermentación de lactosa en tubos inclinados con Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) durante 24 horas. Solo dos levaduras fermentaron lactosa (L1 y L2), las cuales fueron seleccionadas.

Ambas se almacenaron en tubos inclinados con APD para su posterior identificación por medio del API 20C AUX.

### **Identificación de levaduras por medio de API 20C AUX (Biomériux 2009).**

**Preparación de la galería y del inóculo.** Se reunió fondo y tapa de una cámara de incubación, repartiéndose aproximadamente 5 mL de agua destilada en los alvéolos creando una atmósfera húmeda.

Se abrió una ampolla de “API Suspension Medium” (2 mL). Con la ayuda de una pipeta, se extrajo una fracción de la colonia. Se utilizaron cultivos jóvenes de 18 horas de siembra. Se realizó una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón dos de McFarland. Se abrió una ampolla de “API 20 C medium” y se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión anterior. Se homogeneizó con la ayuda de una pipeta, tratando de evitar la formación de burbujas.

**Inoculación y lectura de la galería.** Se llenaron las cúpulas con la suspensión obtenida en el “API C medium”. Se procedió a incubar durante un periodo de 48 a  $72 \pm 6$  horas a  $29 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Una vez culminadas las 48 y 72 horas de incubación, se observó el crecimiento de las levaduras comparándola con la cúpula cero, testigo negativo. Se observó la turbidez presente en cada cúpula reportando un valor positivo. Por medio del programa de identificación Apiweb<sup>TM</sup> se introdujo manualmente el perfil numérico de siete cifras, dando las identificaciones de las tres cepas de levaduras.

**Ensayo Morfológico.** Se determinó la presencia de hifas por medio de una siembra de cada levadura en APD acidificado. Se colocó un cubreobjetos en cada medio sembrado, incubándose durante dos horas a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Finalizado este tiempo, se levantaron los cubreobjetos para observarlos con un microscopio óptico con un objetivo a 40x.

**Evaluación de la capacidad fermentativa en la producción de etanol en tres tipos de sustratos.** Las dos cepas de levaduras (L1 y L2) clasificadas fueron sometidas a pruebas preliminares para la determinación de la capacidad fermentativa. Se activaron las cepas de levaduras en caldo YPG (Extracto de levadura  $10 \text{ g L}^{-1}$ , bactopectona  $10 \text{ g L}^{-1}$  y glucosa  $20 \text{ g L}^{-1}$ ) en tubos con 10 mL del caldo enriquecido. Los tubos fueron incubados durante 24 horas a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se evaluaron tres tipos de sustrato: Caldo enriquecido YPG con 3.7 °Brix, suero dulce con 4.7 °Brix y suero enriquecido con jugo de caña con 12 °Brix. Se obtuvieron seis tratamientos preliminares, inoculándose los dos tipos de levaduras en los tres sustratos, incubándose a  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

**Cualificación de la producción de etanol por medio del método colorimétrico del yodoformo (Durst y Gokel 1985).** Completadas las 48 horas de fermentación, se destilaron los medios fermentados por medio de un rotavapor a una temperatura de 30 °C a 40 rpm.

Obtenido el destilado, se realizó la determinación de la producción de etanol, mediante la prueba cualitativa del yodoformo. La prueba del yodoformo consistió en colocar 2 mL de destilado en un tubo de ensayo, agregándose 2 mL de solución de hidróxido de sodio al 10%.

Realizada la mezcla, se adicionaron varias gotas de una solución de yoduro de potasio al 10%, hasta lograr un color persistente entre amarillo y marrón. Se dejaron reposar los seis tubos con los seis destilados de los diferentes tratamientos, durante cinco minutos, observando un precipitado de color amarillo a partir de una halogenación en medio básico en los tubos, comprobándose la presencia de alcohol. Se observó mayor presencia del precipitado en los destilados del suero enriquecido con jugo de caña.

**Aislamiento de una cepa de levadura proveniente de Fermipan® comercial.** Se realizó un aislamiento por técnica del estriado en placa. Se tomó 1 g de levadura diluyendo hasta obtener una concentración de  $10^{-4}$  incubándose a 35 °C por 48 horas. Se almacenó la colonia en un tubo con agar inclinado con APD acidificado.

**Preparación de los tratamientos para la fermentación de suero a partir de levaduras.** Para la preparación de los tratamientos se utilizaron tres cepas de levaduras (L1, L2 y LC) y dos pH (4.5 y 5). Se recolectó suero de queso crema refrigerándose a 4 °C.

Las cepas de levaduras fueron activadas 24 horas antes de la iniciación de la preparación de los tratamientos. La activación de las cepas de levaduras, consistió en preparar caldo enriquecido YPG, donde se inoculó una asada de levadura, incubándose a 35 °C durante 24 horas.

En seis matraces esterilizados previamente, se colocaron 100 g de suero. Se ajustó el pH de cada tratamiento con ácido tartárico, inoculándose en cada tratamiento las levaduras activadas por triplicado. Todos los tratamientos fueron incubados en una cámara de estabilidad a 35 °C durante 24 horas y con agitación a 200 rpm.

**Cuantificación de etanol por el método de cromatografía de gases.** Finalizadas las 24 horas de fermentación, se llevaron los matraces a refrigeración. Se centrifugaron 15 g de cada muestra durante 25 minutos a 5000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se pasó por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ , colocándose en viales para la inyección. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890, en conjunto con el software ChemStation. Para realizar la cuantificación de etanol, se determinó el área bajo la curva de cada muestra. Se establecieron las siguientes condiciones de análisis: La temperatura del inyector fue de 250 °C en modo split a una relación de 20:1; utilizando una columna capilar J & W Scientific DB-ALC1 (30 m de largo  $\times$  0.32 mm ID  $\times$  1.8  $\mu\text{m}$ ) con un flujo constante de 40 mL/min de nitrógeno; se utilizó un detector FID a 250 °C y la temperatura de horno a 38 °C incrementando hasta 120 °C, a una tasa ascendente de 20 °C/min.

Todo el análisis tuvo un tiempo de corrido de 12 minutos utilizando nitrógeno como gas de acarreo (Casco 2005).

## **Fase dos. Elección de la levadura mejor productora de etanol y realización de la curva cinética.**

### **Elaboración de la curva cinética de la levadura 1 (*Candida Pelliculosa*).**

**Preparación de las muestras.** Se preparó un tubo de ensayo con 10 mL de caldo enriquecido YPG. Se inoculó en el tubo una asada de la levadura *Candida pelliculosa*, 48 horas antes de iniciar el experimento. Incubándose durante 24 horas a una temperatura de 35 °C.

Se prepararon 150 mL de caldo enriquecido YPG en un matraz previamente esterilizado. Se vertió el tubo con los 10 mL de caldo enriquecido activado en el matraz, volviéndose a incubar por 24 horas a 35 °C.

Se preparó un lote de 600 g de suero dulce, el cual fue acidificado con ácido tartárico esterilizado, ajustando el pH a 4.5. Se inoculó el lote de suero, con el caldo enriquecido activado 24 horas antes. Se vertió todo el contenido de suero inoculado en un matraz de 2000 mL previamente esterilizado, cubriendo la boquilla con un tapón de hule, incubándose en una cámara de estabilidad a 35 °C durante 48 horas. Se colocó una jeringa en el tapón de hule, para las extracciones de suero fermentado con intervalo de dos horas. Antes de ingresar el matraz a la cámara de estabilidad, se extrajeron 20 mL del inóculo para realizar los análisis de la hora cero.

Por medio de una jeringa de 20 mL, se extrajo el suero fermentado cada vez que se cumplió el intervalo de dos horas. Los 20 mL de suero, se repartieron para la realización de cada análisis. Inmediatamente cumplido cada tiempo se realizó la medición de pH y el crecimiento celular. El restante de suero extraído fue sometido en un baño de hielo para detener forzosamente la fermentación y realizar los análisis de cuantificación de etanol y lactosa. Cabe señalar que una vez preparadas las muestras, se llevaron a refrigeración, para minimizar las posibles variaciones.

Una vez cumplidas las 24 horas, se dejó cumplir 48 horas de fermentación; en donde se extrajo la última muestra de suero fermentado. A todas las muestras en cada tiempo se realizó la medición de pH, conteo celular, cuantificación de etanol y lactosa.

**Medición de pH.** Fue medido por el potenciómetro Orion 5 “Star Thermo Scientific” de cada muestra extraída.

**Conteo celular (Celeromics Technical Note).** Se realizó por medio de la cámara de Neubauer. Esta es una placa gruesa de cristal como un portaobjetos, con medidas de 30 × 70 × 4 mm de grosor. Es una cámara simple, cuya porción central se encuentra dividida en tres porciones. En la parte superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales

longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de 9 mm<sup>2</sup> de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña.

Para la preparación de la muestra se tomó 1 mL de cada muestra adicionándose a 9 mL de agua peptonada para hacer una dilución de 10<sup>-2</sup>. Se llevó al vortex por siete segundos para homogeneizar. Con la ayuda de una micropipeta se tomó 1 µL del tubo 10<sup>-2</sup> y se aplicó en la zona de conteo, colocándose un cubreobjetos para ser observado con un objetivo a 40x.

Se contabilizaron las células que se encontraron dentro de cada cuadro subdividido en 16 recuadros pequeños, contabilizándose cinco cuadros en su totalidad, contabilizándose con la Ecuación 1.

$$\frac{N \times Volumen}{nc \times dilución} = Concentración \left( \frac{Log \text{ de células}}{ml} \right) \quad [1]$$

N: Número de células.

Volumen: 0,01 cm<sup>2</sup> de superficie × 0,1 mm (profundidad) × 0,01 cm = 0.0001 cm<sup>3</sup> ≅ 10,000.

Nc: Número de cuadros.

Dilución: 10<sup>-2</sup> = 0.01.

**Cuantificación de lactosa por método de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).** Las muestras fueron pesadas en una cantidad de 3.000 ± 0.005 g por duplicado. Se diluyeron las muestras en una mezcla de etanol (99%) y agua destilada 25:25 v/v. Se llevó a baño maría a una temperatura de 80-85 °C durante 20 minutos, tapando la boca del tubo con papel aluminio. Una vez terminado el tiempo establecido, se quitó del baño y se homogeneizó en un vortex durante siete segundos. Inmediatamente se filtró con una jeringuilla de 0.45 µm y se inyectó 1 mL de la solución en un vial, para luego ser inyectado en el equipo. Asimismo se inyectaron los estándares de azúcares, pesándose 10 mg de cada azúcar: lactosa, galactosa y glucosa. Estos estándares se prepararon con una mezcla de etanol (99%) y agua destilada 25:25 v/v.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases de alta presión modelo Agilent con los siguientes módulos: Desgasificador: Modelo G1379A 1100 Series, bomba cuaternaria: Modelo G1311A 1100 Series, Inyector automático: modelo G1329A 1100 series y detector de índice de refracción: Modelo G1362A 1100 Series.

El equipo en la fase estacionaria: Se utilizó un guarda columna Hi - Plex 7.7 × 50 mm, una columna Hi - Plex Calcio 300 × 7.7 mm y 8 µm, la temperatura de columna a 85 °C. En la fase móvil se utilizó agua desionizada, con un detector IR de 40 °C, con una velocidad de flujo de 0.6 mL/min con un tiempo de corrido de 60 minutos. El volumen de inyección fue 20 µL.

**Cuantificación de etanol por medio de cromatógrafo de gases.** Se centrifugaron 10 g de cada muestra extraída a 2000 rpm durante una hora. Con ayuda de una jeringa estéril, se extrajo el sobrenadante y se realizó un filtrado doble de cada muestra con un filtro de 0.45 µm, inyectándose al vial para realizar la cuantificación.

**Realización de prueba de consumo para YPL.** Se realizó una prueba de consumo en sustrato YPL (Extracto de levadura 10 g L<sup>-1</sup>, bactopectona 10g L<sup>-1</sup> y lactosa 20 g L<sup>-1</sup>). Se prepararon tres matraces con 100 g de caldo enriquecido y se inocularon con 10 mL de YPG con L1 pH 4.5 (*Candida pelliculosa*) activadas 24 horas antes de dar inicio. Se tomaron muestras en la hora 0, 8 y 24. Se realizaron los análisis de medición de pH, crecimiento celular, cuantificación de lactosa y cuantificación de etanol.

**Análisis físicos-químicos al suero dulce.** Se realizaron los análisis correspondientes para determinar las características físicas y químicas del suero.

**Humedad (AOAC 952.08).** Se determinó por medio del horno de aire forzado a 105 °C, el resultado fue expresado en porcentaje.

**Contenido de Cenizas (AOAC 923.03).** Se determinó en mufla a 550 °C, cuyo resultado fue expresado en porcentaje.

**Lactosa (AOAC 982.14).** Se realizó la cuantificación de lactosa por el método HPLC.

**Proteínas (AOAC 2001.11).** Se realizó en el equipo Digestor FOSS Tecator 20 y Destilador FOSS Kjeltex 8100, donde se halló el contenido de nitrógeno residual para la conversión de nitrógeno a porcentaje de proteínas, utilizando el factor de conversión 6.25.

**Grasa total (AOAC 984.04).** Se realizó por el método Babcock.

**Sales.** Se realizó la cuantificación basado en el método por titulación con hidróxido de sodio al 0.1 N.

### Diseño Experimental.

**Fase uno.** Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 3 × 2, utilizando tres cepas de levaduras, dos pH (4.5 y 5.0) a una temperatura de 35 °C. Para un total de seis tratamientos evaluados por triplicado para un total de 18 unidades experimentales.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos de la fase uno.

Tratamientos	pH	
	4.5	5.0
Levadura 1	L14.5	L15.0
Levadura 2	L24.5	L25.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (control)	C4.5	C5.0

**Prueba de consumo.** El método para la cuantificación de lactosa sobreestimó a lo largo de la curva de cinética en el suero. Por este factor se realizó la cuantificación de lactosa en YPL para observar si la matriz podría afectar la cuantificación y si la levadura *Candida pelliculosa* consumía lactosa. Se usó un DCA con medidas repetidas en el tiempo para la 0, 8 y 24 horas y dos medios de fermentación (suero y YPL) para L1 con pH inicial de 4.5. Los medios se compararon en el tiempo para etanol, lactosa, crecimiento celular y pH. Además los dos medios de fermentación se compararon para cada día para las diferentes variables descritas.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos para la prueba de consumo.

Medio	Tiempo (h)		
	0	8	24
Suero	Suero 0	Suero 8	Suero 24
YPL <sup>¶</sup>	YPL 0	YPL 8	YPL 24

<sup>¶</sup>Extracto de levadura 10g L<sup>-1</sup>, bactopectona 10g L<sup>-1</sup> y lactosa 20g L<sup>-1</sup>.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza y una separación de medias con la prueba Tukey con la finalidad de encontrar diferencias estadísticas entre las cepas de levaduras partícipes en la fermentación y para la prueba de consumo en la comparación de medios de fermentación en el tiempo, con una probabilidad de 0.05. El programa utilizado fue SAS<sup>®</sup> “Statistical Analysis System” versión 9.3.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 3, se observan los resultados obtenidos en género y especie por medio de la galería API 20C AUX. La levadura 1 recibe el nombre de *Candida pelliculosa*. Asimismo se identificaron las levaduras 2 y control como *Saccharomyces cerevisiae* 2 y 1, respectivamente. Estas últimas utilizaron los mismos sustratos para su crecimiento a excepción de melezitosa y trehalosa, sustratos que no fueron asimilados por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* 1.

La levadura *C. pelliculosa* es también conocida como *Wickerhamomyces anomalus* o *Pichia anomala*, perteneciente al género *Cryptococcaceae*. Esta levadura puede crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, encontrándose con frecuencia en diversas fermentaciones (Hsun Huang *et al.* 2012). *Wickerhamoyces anomalus* es altamente tolerante a las tensiones ambientales, adaptándose a una amplia gama de condiciones de crecimiento, son tolerantes a ácidos y sal produciendo altos niveles de acetato de etilo; en términos de temperatura (3-37 °C), mínima actividad de agua (0.85-0.92) valor de pH (2-12) y la osmolaridad (Capelli *et al.* 2014). Este género ha sido ampliamente utilizado en investigaciones sobre la fermentación de lactosa presente en suero para la producción de etanol. Las especies pertenecientes al género *Candida* producen  $\beta$ -galactosidasa llegando a fermentar lactosa (Petrenko 2004).

El género *Saccharomyces* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*. Se diferencia de las demás levaduras, en cuanto a la capacidad que posee de desdoblar los azúcares individuales, como la glucosa, debido a la presencia de enzimas en su metabolismo. Cuenta con la presencia de la enzima sacarasa, maltasa y cimasa. Sin embargo, no cuenta con la enzima lactasa, por lo cual, no puede fermentar la lactosa pero sí parcialmente la galactosa (Leveau y Bouix 2000).

En un estudio realizado por Vanegas *et al.* (2004), se aislaron e identificaron levaduras nativas colombianas de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula* a partir de diferentes sustratos, usando el kit API 20C AUX. Cunier y Leveau (1979), realizaron un estudio crítico de esta técnica aplicada a la identificación de levaduras del vino, de géneros y especies, manifestando la rapidez y reducción en riesgos de contaminación de la prueba.



Cuadro 3. Identificación de tres cepas de levaduras por medio del API 20C AUX.

Descripción	Codificación según API 20C AUX	Nombre científico
Levadura 1	2444234	<i>Candida pelliculosa</i>
Levadura 2	2004071	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2
Levadura C	2444032	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1

Se caracterizó el suero dulce proveniente del queso crema utilizado como medio de fermentación, el cuál presentó un pH inicial de 6.67. Un suero dulce es considerado aquel que se obtiene de la coagulación de leches no acidificadas por acción enzimática (Rodríguez *et al.* 2010).

La composición química del suero lácteo varía dependiendo del tratamiento térmico al que se someta la leche y a las características intrínsecas del procesamiento del producto lácteo (Petrenko 2004). La lactosa es el principal componente nutritivo (4.5 % p/v), proteína (0.8% p/v) y lípidos (0.5%) (Parra 2009). El mayor componente del suero es el agua, el cual resultó en un 94% de la masa total. La lactosa es el único azúcar que se presenció en el suero dulce, el cual se reportó cerca de 55 g/kg de suero (Cuadro 4). A pesar de que el principal componente sea agua, los demás elementos que se encuentran en menor proporción, son los que constituyen una fuente de contaminación ecológica.

Cuadro 4. Composición del suero dulce de queso crema.

Composición	Media $\pm$ Desviación estándar
Humedad (%)	94.13 $\pm$ 0.14
Sólidos totales (%)	5.87 $\pm$ 0.14
Lactosa (g/kg)¶	55.20 $\pm$ 0.20
Proteína (g/kg)	7.80 $\pm$ 0.05
Grasa (g/kg)	1.50 $\pm$ 0.07
Cenizas (g/kg)	5.60 $\pm$ 0.14
NaCl (g/kg)	3.60 $\pm$ 0.02

g /kg= g de lactosa/kg de suero dulce de queso crema.

La levadura que presentó la mayor media de producción de alcohol fue L1 con pH de 4.5 del género *Candida*, sin embargo fue significativamente igual a L2 pH 5 y LC pH 4.5 y 5 (Cuadro 5). Lactosa es uno de los componentes del lactosuero que es utilizada para la producción de bioetanol (Guimarães *et al.* 2010), donde se deben seleccionar cepas fermentadoras de lactosa por la cual géneros como *Candida*, *Fabospora* y *Kluyveromyces* presentan dicha característica (Szxzodrak *et al.* 1997).

Los factores como temperatura y medio de fermentación pueden influir en los rendimientos bajos de las tres levaduras que pueden tener condiciones óptimas diferentes. La L1 pH 4.5 produjo 0.103 g/kg de etanol con un rendimiento del 8% referente a la lactosa consumida en las primeras dos horas. En un estudio realizado por Sansonetti *et al.* (2009), determinó que *K. marxianus* produjo 23 g/L de etanol con un rendimiento de 97%, este rendimiento se fundamentó al excelente medio de fermentación que fue el suero del queso scotta con bajo contenido de proteína.

La disponibilidad de los nutrientes presentes en un medio de cultivo, deben ser los necesarios para el consumo por medio de las células. En los medios de fermentación existen muchas sustancias que pueden secuestrar o absorber iones metálicos reduciendo la concentración iónica disponible como los aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, polifenoles, polifosfatos y materiales coloidales. El suero lácteo al presentar proteínas en su matriz, puede afectar de tal manera la producción de etanol a partir del mismo (Pirt 1975). La temperatura es un factor que optimizó la producción de etanol para *Candida pseudotropicalis* 65, debido a que en pruebas de fermentación en un rango de 35 a 45 °C, se obtuvieron mejores resultados a 40 °C con rendimiento de 92% etanol (Szzzodrak *et al.* 1997).

Cuadro 5. Producción de etanol de tres cepas de levaduras aisladas.

Tratamiento	pH inicial	Producción de etanol(g/kg) ± DE <sup>∞</sup>
LC <sup>ψ</sup>	4.5	0.097 ± 0.005 <sup>a</sup>
L1 <sup>φ</sup>	4.5	0.103 ± 0.009 <sup>a</sup>
L2 <sup>¶</sup>	4.5	0.000 ± 0.000 <sup>b</sup>
LC	5	0.095 ± 0.002 <sup>a</sup>
L1	5	0.092 ± 0.031 <sup>a</sup>
L2	5	0.0320 ± 0.056 <sup>ab</sup>
Coeficiente de variación (%)		37.8

<sup>∞</sup>DE: Desviación estándar. a-b Medias con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes (P <0.05), LC<sup>ψ</sup>: *S. cerevisiae.*, L1<sup>φ</sup>: *C. pelliculosa*, L2<sup>¶</sup>: *S. cerevisiae* 2.

En la figura 1 se observa la reducción en la cuantificación de la curva de lactosa, hasta la hora seis, esto indica un consumo del disacárido por parte de las levaduras para la producción de etanol. En un estudio donde se evaluó la cinética de la formación de etanol a través de suero por medio de *K. marxianus* se logró determinar el grado de utilización de lactosa para la producción de etanol en términos del valor máximo de la lactosa convertida en etanol (Ariyanti y Hadiyanto 2012).

A partir de la hora ocho, existieron fluctuaciones en la cuantificación de lactosa demostrando un comportamiento inusual. Esto podría deberse a una sobreestimación de la lactosa presente en el medio fermentado, ya que existe cuantificación de etanol aun cuando se contabilice mayor cantidad de lactosa que la inicial. En la realización de la cuantificación por HPLC, existió un aumento en el tiempo de elución de la lactosa,

aumentando desde 11 a 14 minutos dando como resultado una mayor área bajo la curva y por ende una sobreestimación del azúcar en mención. En un estudio realizado por Abásolo (2014), se realizó la validación de cuantificación de azúcares en forrajes por HPLC se encontró que a medida que se incrementaba el tiempo de retención de los azúcares el tiempo de elución aumentaba produciendo un ensanchamiento en los picos provocando una pérdida de sensibilidad del método y una sobreestimación de los azúcares. Con respecto a la cuantificación de etanol, existe un reporte de producción similar a lo largo del tiempo de fermentación. Estudios atribuyen que durante la fermentación, la levadura se ve sometida a una serie de estrés simultáneo y secuencial.

Estos factores podrían ser: limitación de nutrientes, condiciones de anaerobiosis, estrés al etanol y choques térmicos (Chiva 2010). El no haber consumo de lactosa, se relaciona con la poca cuantificación de etanol. La concentración final de alcohol disminuye a medida que la temperatura aumenta, esto se relaciona con una disminución del rendimiento de la producción de etanol y una reducción en el uso de la lactosa (Casey e Ingledew 1986). La disminución en la cuantificación de etanol podría deberse también a que además del etanol y CO<sub>2</sub> los cuales son productos de la fermentación, existe producción de compuestos orgánicos como alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas (Leveau y Bouix 2000), los cuales no fueron cuantificados por el método establecido

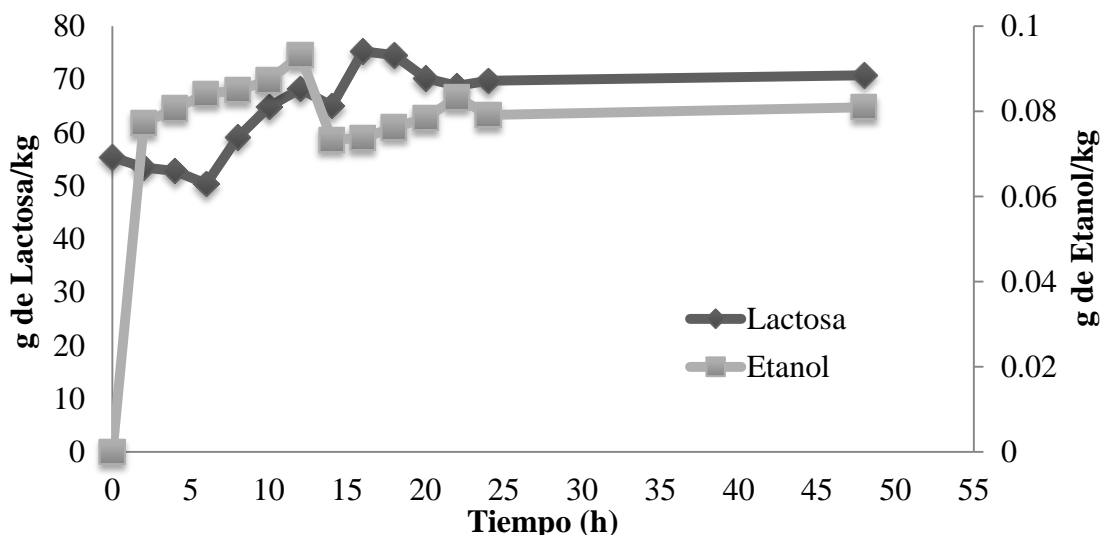


Figura 1. Relación entre el consumo de lactosa y producción de etanol durante 48 horas de fermentación de *C. pelliculosa* pH 4.5 en suero.

En la hora 20 (Figura 2), la levadura presenta el mayor crecimiento celular, empezando a ocurrir un descenso a partir de la hora 22 hasta finalizar las 48 horas de fermentación. La lactosa presenta un descenso desde la hora 0 hasta las 6 horas. Después de ese tiempo, la curva de lactosa aumenta súbitamente, probablemente por una sobreestimación de la lactosa. Según el gráfico presentado, se observa que existe un crecimiento celular pero no una reducción en la lactosa. Esto podría deberse a que la levadura esté utilizando otros medios presentes en el suero.

Cien litros de suero contienen 9 kg de proteína, 50 kg de lactosa y 3 kg de grasa, representando un medio rico nutricionalmente (Ramirez 2013). Las levaduras poseen la capacidad de utilizar ciertos compuestos carbonatados, entre ellos, los glúcidos simples, disacáridos y trisacáridos, al mismo tiempo que es capaz de utilizar otros compuestos carbonatados que incluyen ácidos y alcoholes. Según Levi *et al.* (1979) el género *Candida* posee estas características. En base a esto podría atribuirse que las levaduras están utilizando estos nutrientes, que les permite presentar crecimiento sin consumir la lactosa.

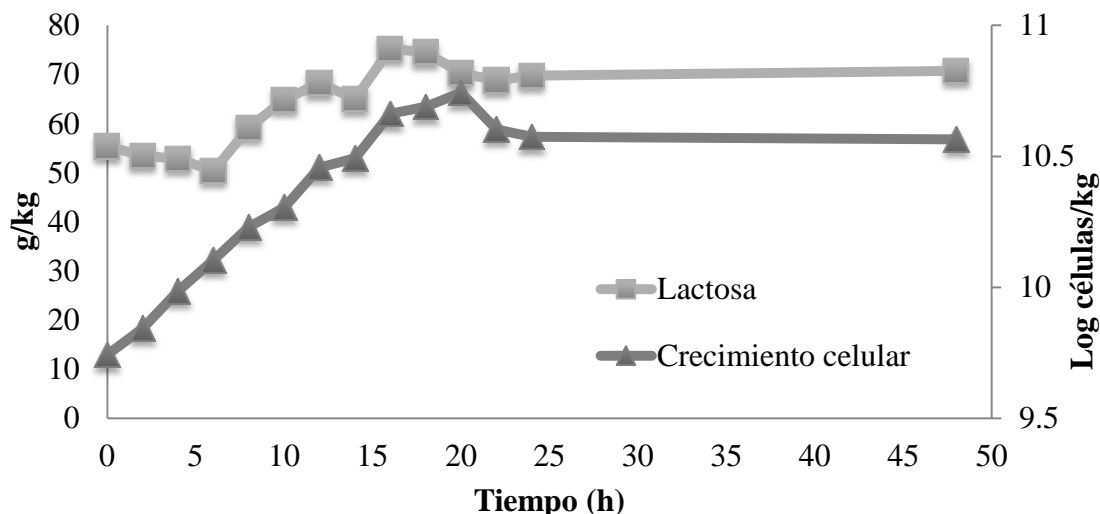


Figura 2. Relación entre el consumo de lactosa y crecimiento celular durante 48 horas de fermentación de *C. pelliculosa* pH 4.5 en suero.

En la figura tres se observa la relación entre el crecimiento celular y el pH. El pH al inicio de la fermentación fue de 4.5 el cual se fundamenta en un estudio realizado por Ariza y Gonzáles (1997), donde se determinó que un pH de 4.5 es adecuado para el crecimiento de las levaduras.

Las levaduras al multiplicarse realizan sus funciones metabólicas modificando el pH del medio (Varela y Grotiuz 2008), sin embargo se observa que el pH no afectó al crecimiento de las levaduras pues estas representan un crecimiento normal (Figura 3). En un estudio donde se midió la influencia del pH ajustado a 4.5, presentó un mayor crecimiento de microorganismos con respecto a una fermentación que se realizó sin ajustar el pH (Ramírez y Pedroza 2001).

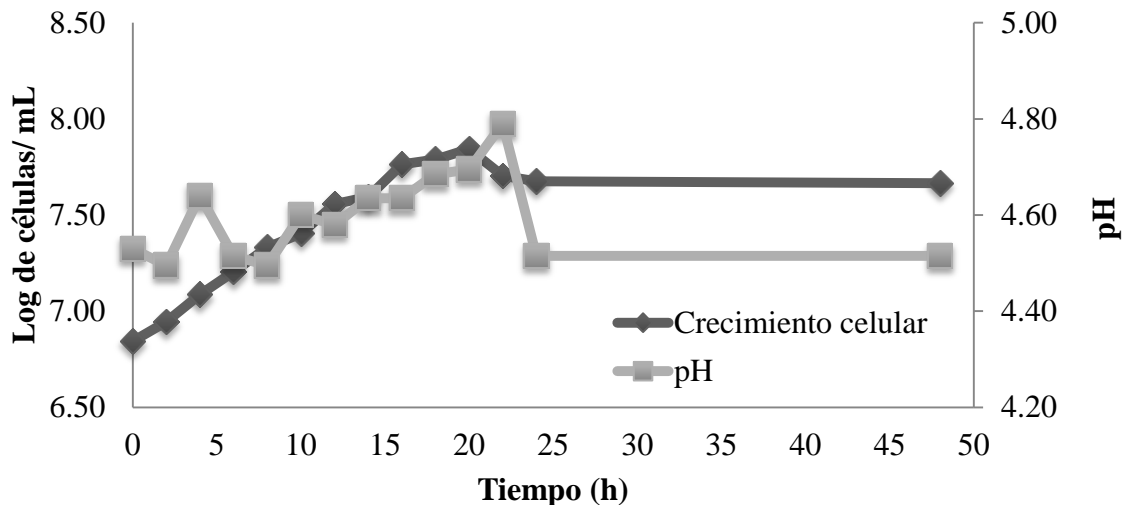


Figura 3. Relación entre el crecimiento celular y el pH durante 48 horas de fermentación de *C. pelliculosa* en suero.

Debido a que en la cuantificación del consumo de lactosa en el tiempo establecido para la realización de la fermentación, no se reportó consumo del azúcar, se realizó una prueba de consumo en caldo YPL (Cuadro 6). Se cuantificaron las variables: Consumo de lactosa, producción de etanol, crecimiento celular y variación del pH, siendo analizadas durante 24 horas con tres mediciones, en la hora 0, 8 y 24. En cuanto al consumo de lactosa se cuantificó un descenso desde el inicio de la fermentación hasta la 24 horas contrario en el suero que se sobreestimó la cuantificación de lactosa a medida que transcurrió el tiempo de fermentación. Esta reducción de lactosa en el medio YPL, comprueba que *Candida pelliculosa* consumió lactosa, debido a que fue el único azúcar presente en el medio YPL. En cuanto a la producción de etanol se observaron en ambos medios fermentados la producción de etanol, aunque con una baja producción, cuyos datos fueron estadísticamente igual a las 24 horas en ambos medios utilizados. Con respecto al crecimiento y a la medición del pH en ambos medios y a través del tiempo de fermentación, la levadura *C. pelliculosa* a pH 4.5, no presentaron diferencias significativas en el crecimiento ni en fluctuaciones de pH, el microorganismo consumió lactosa y se obtuvo una baja producción de etanol.

Durante la fermentación, hay producción o consumo de ácido en el medio según el microorganismo, lo cual produce una variación del pH. El suero es un excelente medio de cultivo, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, sin embargo, su uso no se limita a fermentaciones en los que se usen microorganismos capaces de metabolizar este azúcar (Hayashi 1990). Este puede suministrar las fuentes de carbono y energía necesarias para el desarrollo de diferentes microorganismos y la producción de metabolitos de alto valor (Sánchez *et al.* 2004). Asimismo el caldo enriquecido YPL es un medio compuesto de extracto de lactosa, levadura y peptona, componentes que permiten el crecimiento de las levaduras, al mismo tiempo que significan fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, es por esto que ambos medios de fermentación permitieron el crecimiento celular, quienes concentraron su energía para su crecimiento (Leveau y Bouix 2000).

En la fermentación llevada a cabo en ambos medios no existe una fluctuación significativa en el cambio del pH, lo que denota que no existió mucha actividad por parte del microorganismo, debido al bajo consumo de lactosa (Zumbado 2005). Se puede atribuir el bajo rendimiento de etanol a la posible inhibición en la proceso de fermentación, esto pudo deberse a la formación de otros componentes orgánicos que se producen en la fermentación del suero como glicerol y ácido láctico, compuestos a los que se le atribuye el bajo rendimiento de etanol en un 11.15% en fermentación del suero crudo (Owais y Zafar 2006). Otra variable que puede tomarse en cuenta es la búsqueda de la temperatura óptima debido que la tasa de reacción del microorganismo aumenta con el incremento de la temperatura hasta el límite máximo que se debe investigar (Dragone *et al.* 2011).

Cuadro 6. Cuantificación de etanol, lactosa, pH y crecimiento utilizando *C. pelliculosa* a pH de 4.5 en medio enriquecido y suero para la prueba de consumo.

Variable	Medio	Tiempo (h)		
		0	8	24
Lactosa (g/kg) ± DE <sup>φ</sup>	YPL <sup>α</sup>	47.52 ± 1.05 <sup>a(X)</sup>	46.61 ± 0.99 <sup>a(X)</sup>	42.36 ± 1.44 <sup>b(Y)</sup>
	Suero	55.37 ± 0.20 <sup>a(Y)</sup>	59.13 ± 2.50 <sup>a(XY)</sup>	69.76 ± 1.85 <sup>a(X)</sup>
CV (%)		1.75	5.13	3.87
Etanol (g/kg) ± DE	YPL	0.000 ± 0.000 <sup>(Y)</sup>	0.084 ± 0.003 <sup>a(X)</sup>	0.082 ± 0.021 <sup>a(X)</sup>
	Suero	0.000 ± 0.000 <sup>(Z)</sup>	0.085 ± 0.000 <sup>a(X)</sup>	0.079 ± 0.000 <sup>a(Y)</sup>
CV (%)		-	2.45	26.16
Crecimiento (Log células/ml) ± DE	YPL	6.69 ± 0.03 <sup>a(Y)</sup>	6.92 ± 0.17 <sup>a(XY)</sup>	7.27 ± 0.22 <sup>a(X)</sup>
	Suero	6.85 ± 0.05 <sup>a(Z)</sup>	7.33 ± 0.01 <sup>a(Y)</sup>	7.67 ± 0.00 <sup>a(X)</sup>
CV (%)		0.38	2.51	1.85
pH ± DE	YPL	4.50 ± 0.01 <sup>a(X)</sup>	4.50 ± 0.03 <sup>a(X)</sup>	4.60 ± 0.18 <sup>a(X)</sup>
	Suero	4.53 ± 0.01 <sup>a(X)</sup>	4.50 ± 0.01 <sup>a(Y)</sup>	4.53 ± 0.02 <sup>a(X)</sup>
CV (%)		0.22	0.22	1.86

DE<sup>φ</sup>: Desviación estándar, a-c Medias con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes (P < 0.05), X Y Medias con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes a través del tiempo (P < 0.05), YPL<sup>α</sup>: Extracto de levadura 10 g L<sup>-1</sup>, bactopectona 10 g L<sup>-1</sup> y lactosa 20 g L<sup>-1</sup>.

Los parámetros cinéticos obtenidos para *C. pelliculosa* se visualizan hasta la sexta hora (Cuadro 7), esto debido a que después de este punto el método sobreestimó la cuantificación de lactosa, incluso más que la inicial en el suero. Se puede asumir que existió una sobreestimación de lactosa en el suero debido a que existen diferentes nutrientes que componen este medio, en comparación del medio YPL que solo contiene lactosa en su composición como azúcar disponible.

La mayor tasa de crecimiento se reportó a las dos horas con un valor de  $0.247 \text{ h}^{-1}$ , esta tasa de crecimiento coincide con el mayor rendimiento de etanol que fue igual a  $0.044 \text{ g etanol/g lactosa}$ . El rendimiento obtenido en las primeras dos horas es muy lejano al teórico  $0.538 \text{ g/g}$  que describe Silveira *et al.* (2005), el  $Y_{P/S}$  obtenido en las dos horas representaría  $8.17\%$  de etanol producido en base al valor teórico esperado. En el medio YPL el rendimiento obtenido es  $66.72\%$  de etanol entre las 0-8 horas, esto pudo deberse a que los compuestos que inhiben la producción de etanol no están en concentraciones similares en las del suero en los diferentes intervalos de tiempo. Sobre una base estequiométrica, un mol de glucosa debe producir teóricamente dos moles de etanol. Sin embargo, en la práctica no se logra muy a menudo esta relación, debido a la producción de biomasa y la síntesis de compuestos, tales como proteínas, lípidos y polisacáridos, junto con productos metabólicos como glicerol, ésteres, aldehídos y cetonas (Pachal y Stewart 1980).

Según Djelal *et al.* (2006) en un estudio donde se utilizó la levadura *Hansenula anomala* para la producción de etanol y glicerol en un medio de alta salinidad, se observó que esta levadura para lograr disminuir la actividad de agua, su metabolismo realizó una competición entre las vías que condujeron a la producción de glicerol y etanol originándose una competencia entre la cesación de la producción de etanol, durante el estado estacionario antes de la producción de glicerol. El ajuste osmótico se produjo durante el crecimiento, la producción de glicerol durante el estado estacionario puede estar claramente relacionada con otro mecanismo que no sea el osmótico, sino la excreción de un mecanismo de fermentación para garantizar energía para el mantenimiento de las células de la levadura.

En otro estudio realizado, se evaluaron los factores que afectaron el rendimiento en la producción de etanol para *Candida pseudotropicalis* los cuales fueron temperatura, concentración de lactosa, inóculo de activación y pH inicial. Los factores más relevantes que afectaron la producción de etanol fueron la concentración de lactosa y el pH inicial. Concentraciones de lactosa en un  $5\%$  obtuvo un  $Y_{P/S}$  igual a  $0.37 \text{ g/g}$  con rendimiento de  $68.7\%$  a un pH  $5.5$  durante 48 horas. El pH de  $3$  obtuvo el menor rendimiento igual a  $0.37 \text{ g/g}$  de etanol, los pH  $5$  y  $5.5$  obtuvieron  $0.49 \text{ g/g}$  durante 48 horas de fermentación (Szczodrak 1997).

Cuadro 7. Parámetros cinéticos para *C. pelliculosa* en suero con pH inicial de  $4.5$ .

Tiempo (h) <sup>‡</sup>	$\Delta t$	$\mu^\phi (\text{h}^{-1}) \pm \text{DE}$	$Y_{X/S}^\delta$ (Log célula /g lactosa) $\pm \text{DE}$	$Y_{P/S}^\lambda$ (g etanol/g lactosa) $\pm \text{DE}$	$q_s^\psi$ (g lactosa/ Log células) $\pm \text{DE}$
2	2	$0.247 \pm 0.141$	$0.053 \pm 0.000$	$0.044 \pm 0.018$	$0.032 \pm 0.034$
4	2	$0.139 \pm 0.048$	$0.527 \pm 0.628$	$0.003 \pm 0.004$	$0.005 \pm 0.006$
6	2	$0.091 \pm 0.034$	$0.582 \pm 0.769$	$0.004 \pm 0.004$	$0.038 \pm 0.052$

Tiempo (h)<sup>‡</sup>: Tiempo de fermentación,  $\mu^\phi (\text{h}^{-1})$ : Tasa de crecimiento,  $Y_{X/S}^\delta$ : Rendimiento de células por utilización del sustrato,  $Y_{P/S}^\lambda$ : Rendimiento de etanol por consumo de sustrato,  $q_s^\psi$ : Tasa específica de sustrato por el organismo.

La tasa de crecimiento más alta en el suero ocurre en las primeras dos horas, mientras que en el medio YPL para los intervalos de 0-8 y 8-24 horas presentaron tasas de crecimiento bajas comparadas a las seis primeras horas en el suero (Cuadro 8). En un estudio realizado con la levadura *K. marxianus* la tasa de crecimiento más alta fue  $0.157 \text{ h}^{-1}$  se encontró entre la sexta y octava hora en la fase exponencial, utilizando como medio suero crudo (Owais y Zafar 2006). Esta tasa de crecimiento fue menor a la que presentó *Candida pelliculosa* lo que indica que la levadura puede adaptarse rápidamente a las condiciones del lactosuero.

En un estudio realizado por Zafar y Owais (2006), para *K. marxianus* demuestra que a partir de las 6-8 horas de fermentación se observó un decrecimiento en la tasa de consumo de lactosa, esto pudo haber sido causado por la acumulación de lactosa dentro de la célula, además en otros puntos se pueden aumentar dicha tasa debido al incremento metabólico antes de su muerte. El descenso de la tasa de velocidad de consumo se puede observar para L1 pH 4.5 en suero, donde se visualiza que la tasa de consumo de sustrato fluctúa.

Cuadro 8. Parámetros cinéticos para *C. pelliculosa* en YPL<sup>¶</sup> con pH inicial de 4.5.

Tiempo(h) <sup>‡</sup>	$\Delta t$	$\mu^{\phi} (\text{h}^{-1}) \pm \text{DE}$	$Y_{X/S}^{\delta}$ (Log células/g lactosa) $\pm \text{DE}$	$Y_{P/S}^{\lambda}$ (g etanol/g lactosa) $\pm \text{DE}$	$q_s^{\psi}$ (g lactosa/Log células) $\pm \text{DE}$
8	8	$0.044 \pm 0.034$	$1.033 \pm 1.430$	$0.359 \pm 0.471$	$0.070 \pm 0.098$
24	16	$0.079 \pm 0.019$	$0.233 \pm 0.227$	$0.006 \pm 0.008$	$0.021 \pm 0.022$

YPL<sup>¶</sup>: Extracto de levadura  $10 \text{ g L}^{-1}$ , bactopectona  $10 \text{ g L}^{-1}$  y lactosa  $20 \text{ g L}^{-1}$ , Tiempo (h)<sup>‡</sup>: Tiempo de fermentación,  $\mu^{\phi} (\text{h}^{-1})$ : Tasa de crecimiento,  $Y_{X/S}^{\delta}$ : Rendimiento de células por utilización del sustrato,  $Y_{P/S}^{\lambda}$ : Rendimiento de etanol por consumo de sustrato,  $q_s^{\psi}$ : Tasa específica de sustrato por el organismo.



#### 4. CONCLUSIONES

- Las levaduras aisladas fueron identificadas como *Candida pelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae 1* y *Saccharomyces cerevisiae 2*.
- La levadura *Candida pelliculosa* obtuvo la mayor media de producción de etanol con 0.103 g/kg en 24 horas de fermentación, pero la producción de etanol no fue significativamente mayor que *Saccharomyces cerevisiae 2* y *Saccharomyces cerevisiae 1* (control).
- Se evaluaron los parámetros cinéticos hasta la sexta hora para *Candida pelliculosa* a pH 4.5, donde la mayor tasa de crecimiento fue  $0.247 \text{ h}^{-1}$  que coincidió con el mayor rendimiento de 0.044 g etanol/g lactosa en el intervalo de 0-2 horas en el lactosuero.
- La levadura *Candida pelliculosa* fue capaz de consumir lactosa y producir etanol con bajos rendimientos, debido a que enfocó la energía producida en su crecimiento celular.

## 5. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis superficie respuesta para *Candida pelliculosa* para encontrar las condiciones óptimas para la producción de etanol.
- Realizar otros estudios en la fermentación del suero con cepas fermentadoras de lactosa que son utilizadas en la industria garantizando la ausencia de oxígeno para que de esta manera la levadura se vea forzada a la producción de etanol.
- Realizar los futuros estudios en biorreactores para controlar y monitorear el proceso de fermentación.
- Revisar o utilizar otro método para la cuantificación de lactosa en la fermentación del lactosuero.

## 6. LITERATURA CITADA

Abásolo, P. 2014. Optimización de un método de HPLC con detección mediante Índice de Refracción para la cuantificación de carbohidratos solubles en forrajes. Universidad de Oviedo.

Ariyanti, D. y H. Hadiyanto. 2012. Ethanol Production from Whey by *Kluyveromyces marxianus* in Batch Fermentation System: Kinetics Parameters Estimation. Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis.

Ariza, B. y M. González. 1997. Producción de proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá D.C.

Biomeriux, 2009. API 20C AUX Yeast identification.

Bley, T., T. Urit, C.Löser y M. Wunderlich. 2010. Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. Bioprocess and Biosystems Engineering Vol.34:547-559.

Capelli, A., U. Uliss, M. Valzano, C. Damiani, S. Epis, M. Gabrielli, S. Conti, L. Polonello, C. Bandi, G. Favia e I. Ricci. 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaraiia vector *Anopheles stephensi*. John Wiley & Sons, Ltd. 531-5. doi: 10.1002/yea.2933.

Casco, G. 2005. Caracterización química de tres marcas de aguardiente en Honduras (Tatascán, Yuscarán y Ron Plata). Trabajo de graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 34p.

Casey, G. y W. Ingledew. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. Critical Reviews in Microbiology, 13(3), 219-280.

Celeromics. s. f. Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting (en línea).

Consultado 07 de agosto de 2014. Disponible en:

<http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

Chiva, R. 2010. Mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas temperaturas de fermentación. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona. España.

Cuinier, C. y J. Leveau. 1979. Méthode rapid d' identification des levures des vignobles et des vins à l'aide de la galerie API C. Vignes Vins, 283, 44 p.

Djelal, H., A. Amrane, F. Lahrer y G. Martín. 2005. Effect of medium osmolarity on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing on glucose and ammonium. Journal of Biotechnology. Volume 69, Issue 3, 341-349 p.

Dragone, G., S. Mussato, J. Almeida y J. Teixeira. 2011. Optimal fermentation conditions for maximising the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese powder. Biomass and Bioenergy 35, 1977-1982.

Duarte, A. s.f. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. Universidad Nacional de Colombia.

Durst, H. y Gokel, G. 1985. Química Orgánica Experimental. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España, 489-490 p.

García, M., R. Quintero y A. López. 1993. Biotecnología Alimentaria Editorial Limusa S.A de C.V Grupo Noriega Editores. ISBN 968-18-4522-6. México.

Ghaly, A. y A. El-Taweel. 1995. Effect of nutrient supplements addition on ethanol production from cheese whey using *Candida pseudotropicalis* under batch conditions. Applied Biochemistry and Biotechnology Journal. 53 (1): 107-132

Guimarães, M., J. Texeira y L. Dominguez. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. Biotechnology Advances 28 (2010) 375-384.

Hayaski, H. 1990. Tecnología de Productos Lácteos, Primera Edición, Argentina.

Hsung Huang, C., M. Tzu Chang y L. Huang. 2012. Species identification of *Wickerhamomyces anomalus* and related taxa using  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -tub) DNA barcode marker. John Wiley & Sons, Ltd. Vol 29. DOI: 10.1002/yea.2933. 531-535 p.

Leveau, J. y M. Bouix .2000. Microbiología Industrial. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Levi, J., J. Shennan y P. Ebbon. 1979. Biomass from liquid n-alkanes, In; Rose A.H., Microbial Biomass, p.361. A.P. London.

Merizalde, G. y M. Intriago. 2013. Efecto del tipo de leche y contenido de sal en las características físico-químicas y sensoriales del requesón. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 27 p.

- Miranda, O., I. Ponce, L. Fonseca, M. Cutiño, M. Dízas y C. Cedeño. 2009. Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de bayamo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”. Bayamo. Granma. Rev Cub Aliment Nutr 2009; 19 (1):21-2
- Navarro, A., H. Marangoni, D. y C. Callier. 1986. Producción de etanol por fermentación con alta concentración de levaduras. Revista Argentina de Microbiología 18 (1): 7-11.
- Owais, M. y S. Zafar. 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. Biochemical Engineering Journal 27 (2006) 295–298.
- Pachal, C. y G. Stewart. 1980. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. Journal of the Institute of Brewing Vol. 86, 207-210 p.
- Parra, R. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. Vol. 62. 0304-2847.
- Petrenko, O. 2014. Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo. Universidad de Belgrano. Buenos Aires. 34 p.
- Pirt, S. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Editorial Wiley. Michigan University, 274 p.
- Ramírez, J. 2013. Uso de la fermentación para el aprovechamiento del lactosuero. Universidad del Valle. Colombia.
- Ramírez, G. y J. Pedroza. 2001. Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25 °C en el biorreactor Bioflo 3000 M 1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo. Universidad de la Sabana. Colombia.
- Rodríguez, W., C. Gómez, R. Castro, C. Gonzáles y E. Santos. 2010. Caracterización fisicoquímica del lactosuero en el valle de Tulancingo. Universidad de Guanajuato. México.
- Sánchez, O., M. Ortiz y A. Betancourt. 2004. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp*. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. VI, núm. 43-54 p.
- Sansonetti, S., S. Curcio, V. Calabro y G. Iorio. 2009. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. Biomass and bioenergy 33, 1687–1692.

Silveira, W., F. Passo, F. Mantovani y F. Passos. 2005. Ethanol productions from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbiological Technology* 36, 930 -936.

Szczodrak J., D. Szewczuk, J. Rogalski y J. Fiedurek. 1997. Selection of yeast Strain and fermentation Conditions for High/Yield Ethanol Production from Lactose and concentrated whey. *Acta Biotechnology* 1, 51-61 p.

Terán, J., R. Paez, M. Pirola y E. Schmidt, s.f. Características generales sobre el uso del suero de queso en la Provincia de Santa Fe. Instituto Nacional de Tecnología Industrial.Colombia. 9 p.

Treván, M. 1990. Biotecnología: Principios biológicos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Vanegas, I., M. Yepes, y O. Ruiz. 2004. Producción de Xilitol a partir de levaduras colombianas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6: 31-36 p.

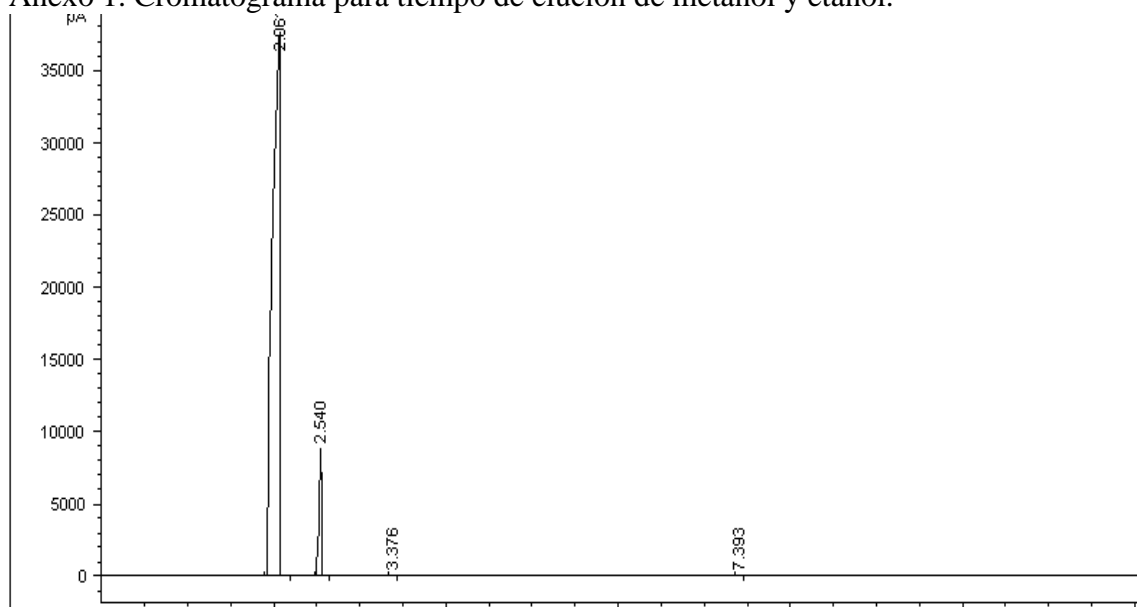
Varela, G. y G. Grotiuz. 2008. Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la República. Uruguay.

Volesky B. y H. Votruba. 1992. Chapter 1. Modelling and optimization of fermentation processes. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Zumbado, W. 2005. Selección de una especie de levadura para la producción de proteína celular utilizando como sustrato el suero residual del proceso de elaboración de queso blanco tipo Turrialba. Universidad Rodrigo Facio, Costa Rica.

## 7. ANEXOS

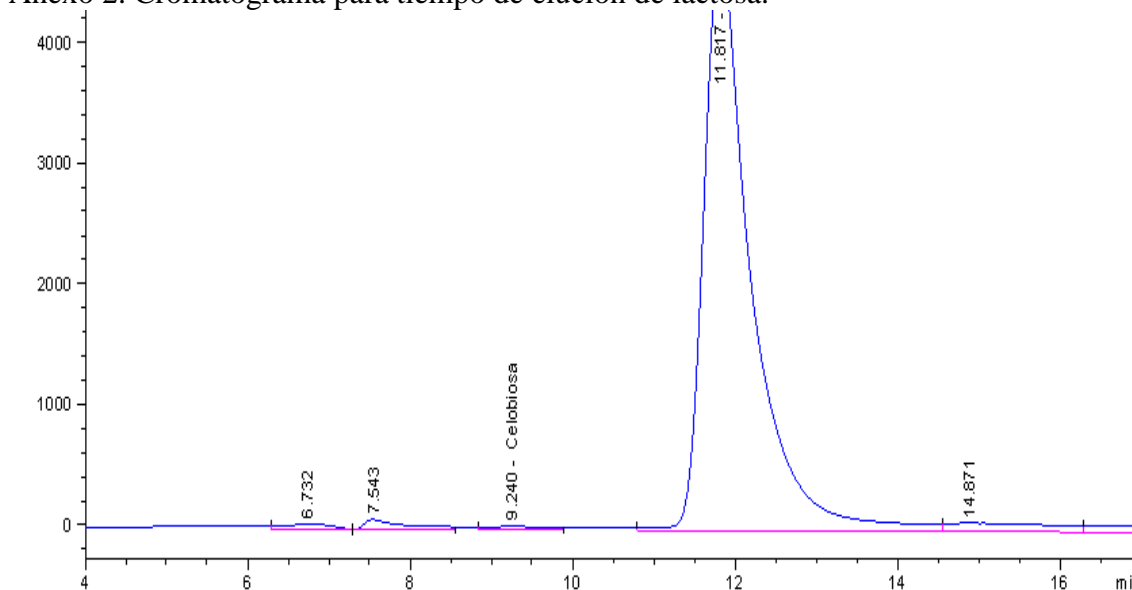
Anexo 1. Cromatograma para tiempo de elución de metanol y etanol.



Tiempo de elución de metanol 2.061 min.

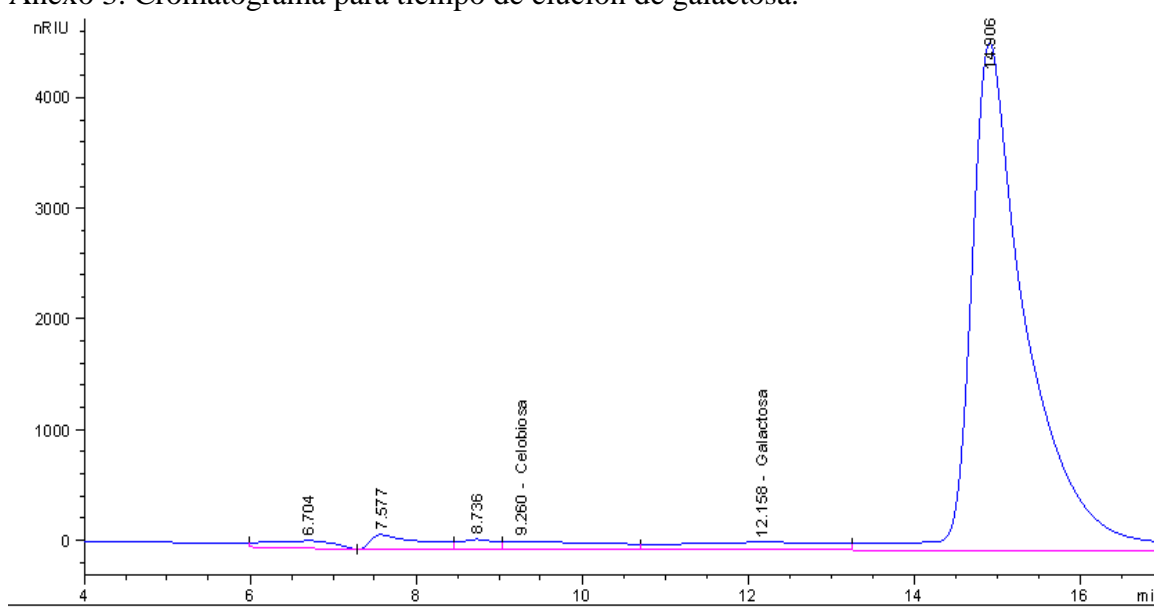
Tiempo de elución de etanol 2.540 min.

Anexo 2. Cromatograma para tiempo de elución de lactosa.



Tiempo de elución de lactosa 11.817 min.

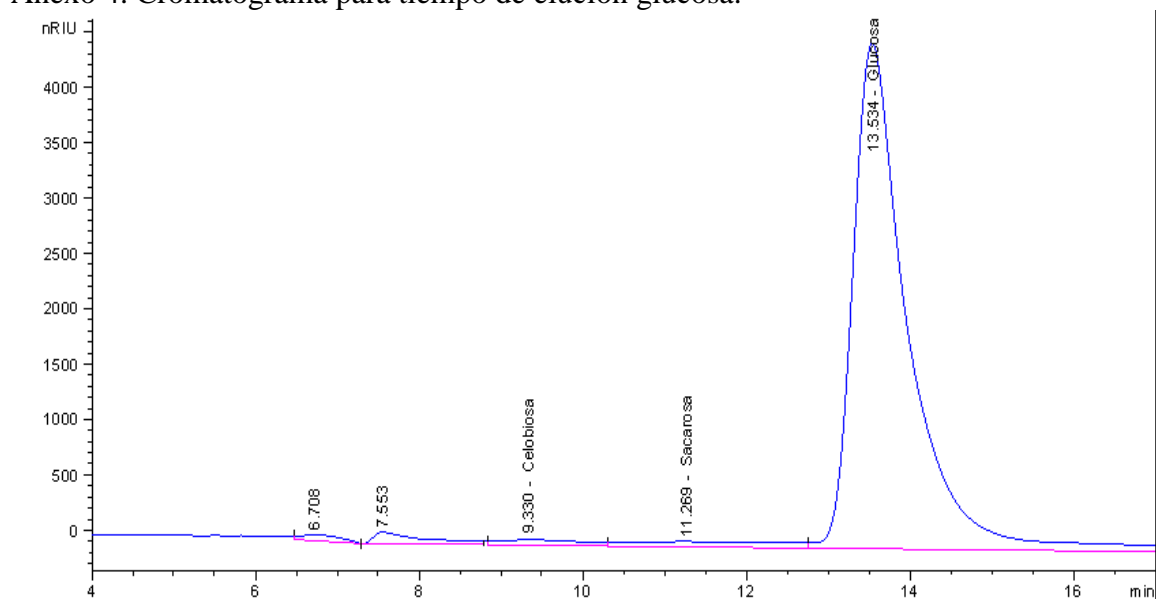
Anexo 3. Cromatograma para tiempo de elución de galactosa.



Tiempo de elución de galactosa 14.906 min.

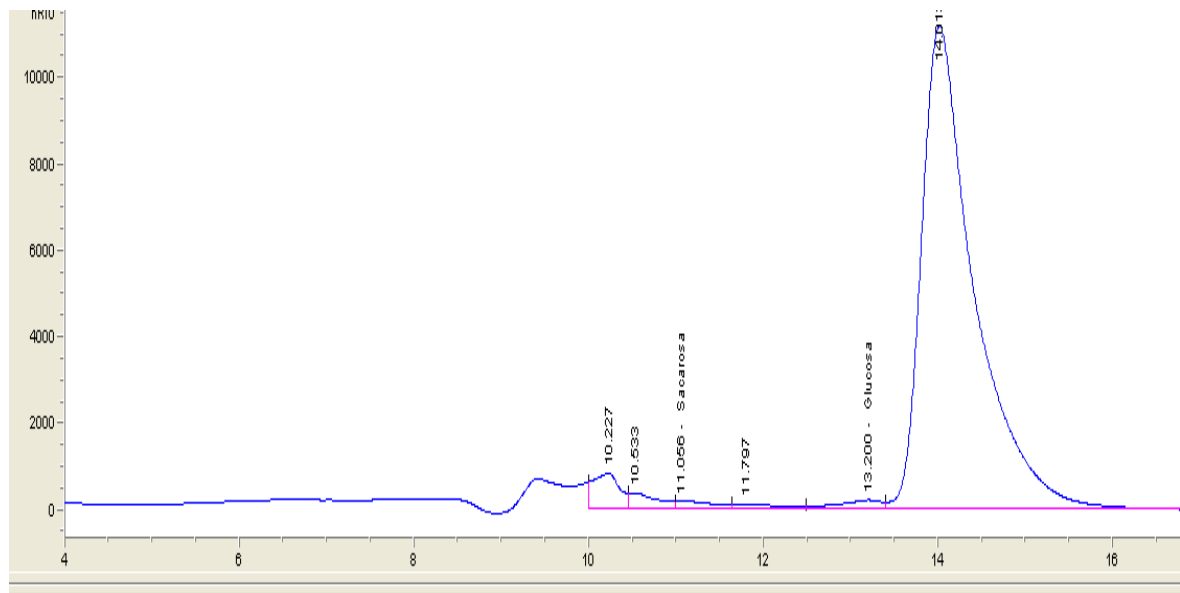


#### Anexo 4. Cromatograma para tiempo de elución glucosa.



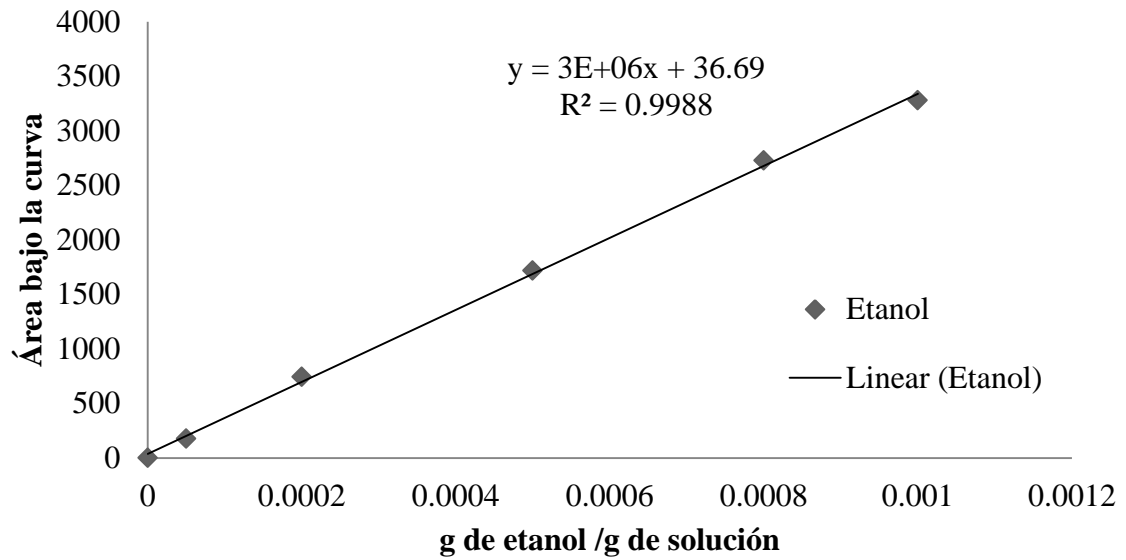
Tiempo de elución de glucosa 13.534 min.

#### Anexo 5. Cromatograma donde se indica el cambio del tiempo de elución de la lactosa.



Tiempo de elución de lactosa 14.013 min.

#### Anexo 6. Curva de calibración del método de etanol cuantificado por GC.



Anexo 7. Cuantificación de lactosa de las dos curvas de cinética de crecimiento.

Tiempo (h)	Lactosa 1 (g/kg)	Lactosa 2 (g/kg)	Promedio (g/kg)	Desviación estándar	CV (%)
0	55.51	55.22	55.37	0.20	0.37
2	54.10	52.79	53.45	0.93	1.73
4	53.91	51.69	52.80	1.57	2.97
6	49.21	51.64	50.42	1.72	3.40
8	60.90	57.37	59.13	2.50	4.23
10	64.25	65.55	64.90	0.92	1.42
12	65.32	71.17	68.24	4.14	6.06
14	68.04	62.02	65.03	4.26	6.55
16	69.94	75.13	72.53	3.67	5.06
18	75.40	73.69	74.54	1.21	1.62
20	71.80	68.73	70.26	2.17	3.09
22	67.94	69.65	68.80	1.21	1.76
24	68.45	71.06	69.76	1.85	2.65
48	68.99	72.53	70.76	2.50	3.54

Anexo 8. Cuantificación de etanol de las dos curvas de cinética de crecimiento.

Tiempo (h)	Etanol 1 (g/kg)	Etanol 2 (g/kg)	Promedio (g/kg)	Desviación estándar	CV (%)
0	0	0	0	0	0
2	0.08	0.08	0.08	0.00	3.19
4	0.08	0.08	0.08	0.00	2.78
6	0.09	0.08	0.08	0.00	2.55
8	0.09	0.09	0.09	0.00	0.27
10	0.09	0.09	0.09	0.00	2.14
12	0.09	0.09	0.09	0.00	0.41
14	0.07	0.07	0.07	0.00	0.61
16	0.08	0.07	0.07	0.00	1.57
18	0.08	0.07	0.08	0.00	4.08
20	0.08	0.08	0.08	0.01	5.80
22	0.08	0.09	0.08	0.01	7.39
24	0.08	0.08	0.08	0.00	0.39
48	0.08	0.08	0.08	0.00	0.67