

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“EVALUACIÓN DEL USO DE UN SOPORTE DE INMOVILIZACIÓN PARA
LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 1.5G A PARTIR DE LACTOSUERO
POR UN CONSORCIO DE *Kluyveromyces spp.* AISLADOS DE KÉFIR
EMPLEANDO UN SOLVENTE EXTRACTIVO EN UN REACTOR BATCH.”**

Trabajo de Investigación presentado por las bachilleres:

ALEXANDRA DANIELA BARRIOS EGUILUZ

KATHERINE QUISPE MARIBAL

Para obtener el Título Profesional de Ingenieros Biotecnólogos

Asesor:

Ing. Francisco Javier Roque Rodríguez

AREQUIPA-PERÚ

2014

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
ABREVIATURAS.....	XVII
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
VARIABLES DE ESTUDIO.....	5
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Kluyveromyces spp y cepas microbianas fermentativas productoras de etanol.....	6
2.2. Kéfir.....	8
2.3. Lactosuero.....	12
2.4. Rutas Metabólicas para la obtención de Etanol.....	20
a) Fermentación Alcohólica.....	20
b) Fermentación de Lactosa a Bioetanol.....	20
c) La Fermentación Extractiva.....	23
2.5. Soporte de Inmovilización.....	27
2.6. Biocombustibles y Bioetanol.....	30
a) Propiedades y usos de bioetanol.....	31

CAPÍTULO III.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	32
3.2. MATERIALES.....	32
3.2.1. Material Biológico.....	32
3.2.2. Material de vidrio.....	32
3.2.3. Reactivos.....	33
3.2.4. Equipos.....	34
3.2.5. Otros.....	35
3.3. MÉTODOS.....	36
3.3.1. Obtención de muestra de Kéfir.....	36
3.3.2. Activación y producción de los gránulos de Kéfir.....	36
3.3.3. Caracterización Físicoquímica del Kéfir.....	37
3.3.4. Aislamiento del consorcio de levaduras <i>Kluyveromyces</i> spp. obtenidas de la muestra de kéfir.....	39
3.3.5. Caracterización Bioquímica y Morfológica de las colonias.....	41
3.3.6. Recolección de muestras de lactosuero proveniente de empresas lácteas de la provincia de Arequipa.....	43
3.3.7. Determinación de las características Físicoquímicas del lactosuero.....	43
a) Determinación de Lactosa.....	43
3.3.8. Tratamiento del suero de leche.....	45
3.3.9. Elaboración del Medio de Fermentación.....	45

3.3.10. Cinética de crecimiento, consumo de Lactosa y producción de Bioetanol.....	46
a) Preparación del Inóculo.....	46
b) Determinación de la cinética de crecimiento.....	46
c) Métodos de Análisis.....	46
3.3.11. Balance Estequiométrico para la producción de Bioetanol 1.5 G	48
3.3.12. Diseño del sistema de fermentación Batch: Comparación entre dos sistemas de fermentación: con soporte y sin soporte en un reactor Batch.....	49
a) Sistema de Fermentación sin soporte.....	49
b) Sistema de Fermentación con soporte.....	50
3.3.13. Análisis Estadístico.....	54
3.4. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	55
CAPITULO IV.....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
4.1. Obtención de muestra de Kéfir.....	56
4.2. Activación y producción de los gránulos de Kéfir.....	56
4.3. Caracterización Físicoquímica del Kéfir.....	57
4.4. Aislamiento del consorcio de levaduras Kluyveromyces spp. obtenidas de la muestra de kéfir.....	59
4.5. Caracterización Bioquímica y Morfológica de las colonias aisladas.....	65
4.6. Recolección de muestras de lactosuero proveniente de empresas lácteas de la provincia de Arequipa.....	72
4.7. Determinación de las características físicoquímicas del lactosuero.....	72
a) Determinación de Lactosa.....	73
4.8. Tratamiento del suero de leche.....	74

4.9. Cinética de crecimiento, consumo de Lactosa y producción de Bioetanol de las cepas seleccionadas.....	75
4.10. Balance Estequiométrico para la producción de Bioetanol 1.5 G.....	83
4.11. Comparación entre dos sistemas de fermentación: con soporte y sin soporte en un reactor Batch.....	85
a) Determinación de Bioetanol 1.5 G en la Fase Acuosa.....	87
b) Determinación de Bioetanol 1.5 G en el Solvente de Extracción.....	90
CAPITULO V.....	96
CONCLUSIONES.....	96
RECOMENDACIONES.....	98
REFERENCIAS.....	99
ANEXOS.....	108
ANEXO 1. Cálculos.....	108
ANEXO 2. Datos Curva de Calibración Lactosa.....	109
ANEXO 3. Datos Curva de Calibración Bioetanol 1.5G.....	109
ANEXO 4. Evaluación de las seis cepas aisladas de Kéfir.....	110
ANEXO 5. Hoja de Cálculo de Balance Estequiométrico.....	114
ANEXO 6. Datos Obtenidos En Sistemas Sin Soporte y Con Soporte.....	115
ANEXO 7. Galería de Fotos.....	117
ANEXO 8. Certificación.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Gránulos de Kéfir.....	8
Figura N° 2. Estructura química de kefirán.....	11
Figura N° 3. Estructura molecular de la lactosa.....	14
Figura N° 4. Conversión enzimática de la lactosa en glucosa y galactosa.....	21
Figura N° 5. Metabolismo de la lactosa.....	22
Figura N°6. Diseño del sistema de fermentación para la producción de bioetanol 1.5 G. A) Diseño del sistema de fermentación sin soporte. B) Diseño del sistema de fermentación con soporte.....	51
Figura N°7. Diagrama en bloques de la celda electroquímica, del potencióstato y del sistema de adquisición de datos.....	53
Figura N°8. Crecimiento en el medio de cultivo Agar Saboraud (A) Cepa L1a, (B) Cepa G1b, (C) Cepa L2a, (D) Cepa L2b, (E) Cepa G3a,(F) Cepa L4a, (G) Cepa L5a, (H) Cepa G5b.....	59
Figura N°9. Coloración de GRAM de las cepas obtenidas. (A) Cepa L1a, (B) Cepa G1b, (C) Cepa L2a, (D) Cepa L2b, (E) Cepa G3a, (F) Cepa L4a, (G) Cepa L5a, (H) Cepa G5b.....	60
Figura N°10. Resultados de la prueba del TSI para las cepas aisladas.....	62
Figura N°11. Medio de cultivo líquido selectivo para <i>Kluyveromyces spp.</i> con crecimiento.....	63
Figura N°12. Fotografías de las 6 cepas seleccionadas, cultivadas en medio MY a 37°C por 72 horas (A) Cepa L2a, (B) Cepa L2b, (C) Cepa G3a, (D) Cepa L4a, (E) Cepa L5a, (F) Cepa G5b.....	64
Figura N° 13. Observación microscópica a 100 X con coloración Gram de las 6 cepas seleccionadas. (A) Cepa L2a, (B) Cepa L2b, (C) Cepa G3a, (D) Cepa L4a, (E) Cepa L5a, (F) Cepa G5b.....	65
Figura N°14. Resultados de la prueba del TSI para las seis cepas aisladas.....	67
Figura N° 15. Resultado de la prueba del citrato para las cepas aisladas.....	68
Figura N°16. Resultados de la fermentación de azúcares (A) fermentación de Maltosa (B)	

fermentación de Glucosa (C) fermentación de Galactosa (D) fermentación de Lactosa... ..69	
Figura N° 17.Determinación de bioetanol 1.5G de las cepas aisladas, mediante el método del yodoformo.....70	
Figura N° 18. Curva de calibración para la evaluación de la producción de lactosa (g/L)...74	
Figura N° 19. Curva de calibración para la evaluación de bioetanol 1.5G (g/L).....76	
Figura N° 20. Cinética de consumo de lactosa, producción de Bioetanol 1.5 G y crecimiento de biomasa para seis cepas aisladas de Kéfir. a) L2a, b) L4a, C) L5a, d) L2b, e) G3a y f) G5b.....77	Figura N° 21.
Diagrama de barras para comparación de consumo de lactosa, producción Bioetanol 1.5G y crecimiento de biomasa a un tiempo de 13 horas para las seis cepas en estudio.....79	
Figura N° 22. Comparación de promedio de producción de Bioetanol 1.5G en g/L para las seis cepas en estudio a un tiempo de 13 horas.....82	
Figura N°23. Microscopía electrónica de la superficie de pepas de aceituna utilizadas como soporte de inmovilización.....86	
Figura N° 24. Producción de Bioetanol 1.5G en reactores tipo Batch. a) Sin soporte, b) Con soporte de inmovilización.....88	Figura
N° 25. Diagrama de caja y bigotes para la producción de Bioetanol 1.5G en g/L para los reactores sin y con soporte.....89	Figura
N°26. Voltamograma cíclico (último ciclo) realizado sobre el electrodo de platina utilizando como solución electrolítica NaOH (0,1 mol L ⁻¹) con velocidad de barrido de 100 mV s ⁻¹90	
Figura N°27. Voltametrías lineares obtenidas sobre o electrodo de platina, para diferentes concentraciones de Bioetanol91	
Figura N°28. Curva analítica de la variación de la concentración de Bioetanol en función de la corriente de pico.....92	
Figura N°29. Hoja de Microsoft Excel con macros en visual basic con balance estequiométrico (Estequiometria Microbiana xlsx. en Microsoft Excel 2007).....114	

Figura N°30. Fotografía de reactor Batch utilizado en la producción de Bioetanol 1.5G.
.....117

Figura N° 31. Equipo utilizado para la detección de Bioetanol 1.5G en el solvente de extracción.....118

Figura N° 32. Fotografía de la celda eletroquímica de un compartimiento, siendo constituida por: (1) electrodo de trabajo, (2) electrodo de referencia, (3) contra electrodo, (4) entrada de nitrógeno y (5) salida de gases.....118



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Variables independientes.....	5
Tabla N°2. Variables dependientes.....	5
Tabla N°3. Microbiota típica aislada de los gránulos de Kéfir.....	10
Tabla N°4. Composición de aminoácidos presentes en la enzima β -Galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis sp.</i>	16
Tabla N°5. Composición media del lactosuero.....	18
Tabla N°6. Composición de Ácidos grasos del aceite de soya.....	26
Tabla N°7. Composición elemental del hueso de aceituna.....	29
Tabla N°8. Composición del medio Sabouraud con cloranfénicol.....	39
Tabla N°9. Composición del medio de aislamiento.....	40
Tabla N°10. Composición del medio YM.....	41
Tabla N°11. Elaboración de la curva de calibración para determinación de lactosa.....	44
Tabla N°12. Composición del medio de Fermentación.....	45
Tabla N°13. Reactivos empleados en la curva de calibración para la determinación de Bioetanol 1.5 G.....	47
Tabla 14. Composición Fisicoquímica del Kéfir.....	57
Tabla N° 15. Análisis sensorial de la leche fermentada obtenida al final de la fermentación.....	58
Tabla N°16. Caracterización microscópica mediante Tinción GRAM de las cepas aisladas.....	61
Tabla N° 17. Resultados obtenidos para TSI.....	61
Tabla N°18. Características macroscópicas de las cepas aisladas del kéfir.....	64
Tabla N°19. Caracterización microscópica mediante tinción GRAM de las seis cepas aisladas.....	66
Tabla N° 20. Resultados de la prueba TSI para las seis cepas aisladas.....	67
Tabla N° 21. Resultados de la prueba de citrato para las seis cepas aisladas.....	68
Tabla N°22. Resultados de la fermentación de azúcares.....	70
Tabla N°23. Resumen de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las levaduras aisladas.....	71

Tabla N°24. Tabla resumen de identificación de las levaduras aisladas.....	72
Tabla N°25. Parámetros fisicoquímicos del lactosuero.....	73
Tabla N° 26. Parámetros fisicoquímicos del lactosuero tratado.....	75
Tabla N°27. Análisis de varianza para la producción de Bioetanol 1.5G de seis cepas aisladas de Kéfir.....	80
Tabla N°28. Comparación de la concentración de Bioetanol 1.5G en g/L a tiempo 13 horas.....	81
Tabla N°29. Comparación de la concentración de Bioetanol 1.5G en g/L a tiempo 13 horas para reactores sin y con soporte.....	89
Tabla N°30. Valores de concentración de Bioetanol 1.5G obtenido para las muestras.....	93
Tabla N° 31. Comparación de producción de Bioetanol 1.5G entre sistema de fermentación con soporte y sistema de fermentación sin soporte.....	93
Tabla N°32. Curva de calibración para lactosa en g/L.....	109
Tabla N°33. Curva de calibración para Bioetanol 1.5G en g/L.....	109
Tabla N°34. Concentración de la producción de Bioetanol 1.5G en g/L para seis cepas seleccionadas.....	110
Tabla N°35. Resumen de producción de Bioetanol 1.5G en g/L para seis cepas seleccionadas.....	111
Tabla N°36. Resumen de consumo de lactosa en g/L para seis cepas seleccionadas.....	112
Tabla N°37. Resumen de incremento de biomasa en g/L para seis cepas seleccionadas.....	113
Tabla N°38. Producción de etanol en g/L en reactores Batch sin y con soporte de inmovilización.....	115
Tabla N°39. Concentración de la producción de Bioetanol 1.5G en g/L para seis cepas seleccionadas.....	116

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, al Divino Niño, por darme las fuerzas para seguir a pesar de los inconvenientes, porque día a día me da la fortaleza para poder realizar una de mis grandes metas.

A mi padre José por todo su amor, comprensión y quien me apoyo y alentó para continuar, cuando parecía que las cosas no iban bien, por creer en mí, sacarme adelante y dándome ejemplos de superación, gracias por estar a mi lado y ayudarme a alcanzar mi meta.

A mi madre Teresa Graciela que se me cuida desde el cielo y es mi impulso a levantarme y seguir cada vez que hay dificultades.

A mis hermanas Tania, Verónica, Joyce y Katlin que me motivaban a seguir, por ser mis amigas, porque son un ejemplo a seguir, gracias por confiar en mí y por alentarme.

A mis sobrinas y sobrinos, quisiera nombrarlos a cada uno de ustedes; pero son muchos, pero eso no quiere decir que no me acuerde de cada uno, a todos los quiero mucho y más que sobrinos son como mis amigos.

A mi prima Yohana quien fue un gran apoyo emocional durante el tiempo en que escribía esta tesis.

A toda mi familia por mostrarme su apoyo y su confianza, gracias por estar a mi lado los quiero mucho.

Para ellos es esta dedicatoria, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

Alexandra Daniela Barrios Eguiluz

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico principalmente a Dios, al Señor de los Milagros y a la Virgen de Guadalupe, por haberme dado la vida, quienes supieron darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, porque día a día llenaron mi corazón y mi mente con la fortaleza necesaria para llegar a cumplir uno de mis tan anhelados sueños, y sobre todo por haberme regalado una familia maravillosa.

A mis padres Frida y Pastor porque creyeron en mí y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta. Mamá, gracias por ser la amiga y compañera que me ayudó a crecer, por estar conmigo en todo momento y confiar en mí. Gracias por brindarme tu fortaleza en los momentos más difíciles, por el amor incondicional que me das, no me alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que haces por mí, te quiero mucho. Papá, gracias por tu apoyo, la orientación y por ayudarme a tomar decisiones que me ayudaron a salir adelante.

A mi hermana Gabriela, soy muy feliz por tenerte como hermana y como mi mejor amiga. Gracias por compartir tu vida conmigo.

A mi Mamá Betty y Papá Lino, que siempre estuvieron impulsándome y aconsejándome, porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.

A mis Tíos, ustedes representan una gran inspiración en mi vida y un gran ejemplo a seguir, gracias por confiar en mí y brindarme su apoyo.

A mi Tía Nelly y Mamá Aleja, que a pesar de no estar físicamente conmigo, sé que siempre me acompañan en cada paso que doy, siempre estarán en mi corazón.

A toda mi familia, gracias por su apoyo incondicional, y sobre todo gracias por ser una maravillosa familia.

Katherine Quispe Maribal

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis principalmente nos gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirnos para llegar hasta donde hemos llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la Universidad Católica De Santa María, al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica, por darnos la oportunidad de estudiar y ser profesionales.

A nuestro asesor de tesis, Ingeniero Francisco Javier Roque Rodríguez por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en nosotras que podamos terminar nuestra tesis.

También nos gustaría agradecer a nuestros profesores durante toda nuestra carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a nuestra formación.

Al Dr. Giancarlo Salazar, la Dra. Katlin Barrios y al técnico de laboratorio en Química Samir Hipólito dos Santos del laboratorio de Electroquímica e Nanotecnología del Instituto de Tecnología e Pesquisa, de la Universidad de Tiradentes–Brasil por la ayuda brindada para el desarrollo de la parte experimental de nuestra tesis.

A nuestros jurados, por su amabilidad, buena disposición, paciencia y por el tiempo que nos dedicaron para que este trabajo culminara exitosamente.

A nuestro grupo de investigación BIOGALE por brindarnos su apoyo incondicional.

A nuestra querida amiga Magaly por su apoyo moral y su gran amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de nuestras vidas profesionales a las que nos encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de nuestras vidas. Algunas están aquí con nosotras y otras en nuestros recuerdos y en nuestros corazones, sin importar en donde estén queremos darles las gracias por formar parte de nosotras, por todo lo que nos han brindado y por todas sus bendiciones.



RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del uso de pepas de aceituna como soporte de inmovilización para la producción de bioetanol 1.5G (etanol producido a partir de lactosuero ácido por un consorcio de *Kluyveromyces spp.* aislados de kéfir) empleando un reactor batch y aceite de soya como solvente de extracción. Las cepas de *Kluyveromyces spp.* fueron aisladas de una muestra de kéfir, la muestra de kéfir utilizada, obtenida de un proveedor independiente de la ciudad de Lima, transportada por vía terrestre en un recipiente de vidrio, dicha muestra fue caracterizada fisicoquímicamente, obteniendo 11,604 g de biomasa al final del proceso de fermentación, pH de 4,37, acidez titulable de 0,774%, humedad de 88,65%, sólidos totales 11,35%, densidad 1,0437g/ml. A partir de la muestra de kéfir se obtuvieron 8 cepas en el medio *saboraud* suplementado con cloranfenicol, dichas cepas fueron sembradas en TSI e inoculadas en medio selectivo para *Kluyveromyces spp.*, posteriormente se seleccionaron seis cepas utilizando como referencia el consumo de azúcares y la turbidez del medio selectivo. Se utilizaron pruebas bioquímicas y morfológicas para confirmar que las seis cepas aisladas pertenecían al género *Kluyveromyces spp.* Posteriormente fueron sembradas en medio YM. Para seleccionar las cepas de *Kluyveromyces spp.* más eficientes se realizó una cinética de crecimiento, en la cual se determinó el consumo de lactosa, biomasa y producción de bioetanol 1.5G. Se

seleccionaron dos cepas L2a y L5a como cepas con mayor capacidad productora de bioetanol 1.5G. Las cuales fueron utilizadas en la formación del consorcio. La producción de bioetanol 1.5G usando la cepa L2a fue de $25,3707 \pm 0,0337$ g/L y de $24,8919 \pm 0,0527$ g/L para la cepa L5a. Para la elaboración del medio de fermentación se empleó el lactosuero ácido, que fue obtenido de la empresa LAIVE S.A y caracterizado fisicoquímicamente obteniendo un pH de 5,45, materia grasa 0,57%, densidad 1,022 g/ml, lactosa 3,09%, sólidos no grasos 5,80%, sólidos totales 6,37% y proteínas 2,15%. El lactosuero fue sometido a un tratamiento termoácido. El medio de fermentación se elaboró suplementando el lactosuero con extracto de levadura, sulfato de amonio y sulfato de magnesio. Seguidamente, se realizó un inóculo con las cepas seleccionadas para la formación del consorcio (L2a y L5a). Posteriormente se realizaron dos sistemas de fermentación. En el primer sistema se utilizó 63,66 g de pepas de aceituna como soporte de inmovilización y en el segundo sistema no se empleó soporte de inmovilización. Para ambos sistemas se utilizó el inóculo (10%) preparado anteriormente para 1,5 L del medio de fermentación. Transcurridas 8 horas se colocó 1,5L de aceite de soya como solvente de extracción, y se comenzó a sacar muestras cada hora; y así para ambos sistemas se obtuvieron 12 muestras. En estas muestras se determinó la producción de bioetanol 1.5G en la fase acuosa y en el solvente de extracción. Para el sistema de fermentación sin soporte se obtuvo $19,9102 \pm 0,6031$ g/L de bioetanol 1.5G en la fase acuosa y 6,2 g/L de bioetanol 1.5G en el aceite de soya utilizado como solvente extractivo, en el sistema de fermentación con soporte se obtuvo, $23,9569 \pm 1,0591$ g/L de bioetanol 1.5G en la fase acuosa y 20 g/L de bioetanol 1.5G en el aceite de soya utilizado como solvente extractivo. Se obtuvo una eficiencia de 39,9972% para el sistema de fermentación sin soporte y 67,3359% para el sistema de fermentación con soporte. Concluyendo así que el uso del soporte de inmovilización es determinante en la producción de bioetanol 1.5G por fermentación.

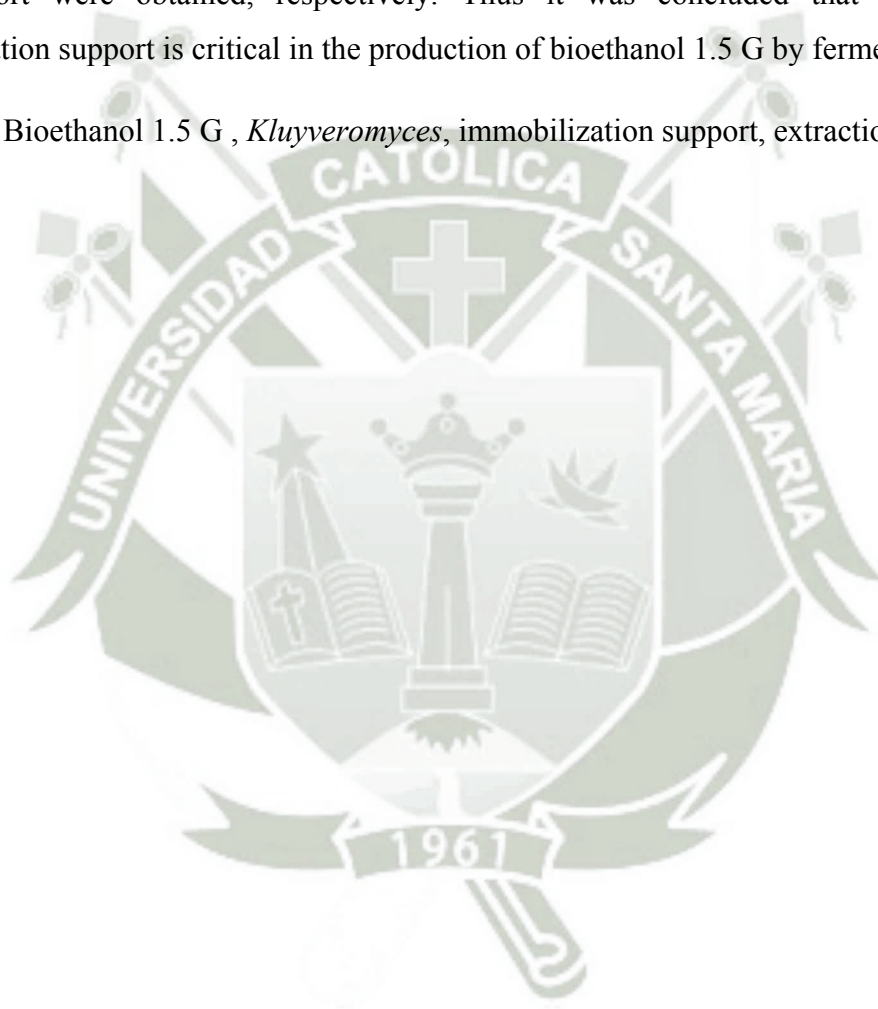
Palabras clave: Bioetanol 1.5G, *Kluyveromyces*, soporte de inmovilización, solvente de extracción.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of using olive pits as immobilization support for the production of bioethanol 1.5 G (ethanol produced from acid whey by a consortium of *Kluyveromyces spp.* isolated from kéfir) using a batch reactor and soybean oil as solvent extraction. The *Kluyveromyces spp.* strains were isolated from a kéfir sample that was obtained from an independent supplier at Lima city, transported by land in a glass container. The sample was physicochemically characterized, obtaining 11,604 g of biomass at the end of the fermentation process, with pH 4.37, a titratable acidity of 0.774%, moisture of 88.65%, total solids of 11.35% and density of 1.0437 g/ml. Eight strains were obtained from the kéfir sample in Sabouraud medium supplemented with chloramphenicol. These strains were seeded in TSI and inoculated in selective medium for *Kluyveromyces spp.*; later six strains were selected using as reference the consumption of sugars and turbidity of selective medium. Biochemical and morphological tests were used to confirm that all six isolates strains belonging to the *Kluyveromyces spp.* gender. They were then seeded in YM medium. A growth kinetics study, in which the consumption of lactose, biomass and bioethanol 1.5 G production was evaluated, was carried out to select the more efficient *Kluyveromyces spp.* strains. Two strains, named L5a L2a, with the higher bioethanol 1.5 G production capacity were selected, and were used in the formation of the consortium. The production of bioethanol 1.5 G was 25,3707 +/-0,0337 and 24,8919 +/-0,0527 for L2a and L5a strains, respectively. Acid whey was used for the preparation of the fermentation media, which was obtained from the LAIVE S.A. Company and physicochemically characterized obtaining a pH of 5.45, fat 0.57%, density 1.022 g/ml, lactose 3.09%, non-fat solids 5.80%, total solids 6.37% and protein 2.15%. The whey was thermoacid treated. The fermentation medium was prepared by supplementing the whey with yeast extract, ammonium sulfate and magnesium sulfate. Afterwards, an inoculum containing the selected strains was performed for the formation of the consortia (L2a and L5a). Later, two fermentation systems were prepared. 63,66 g of olive-seed was used as a support for immobilization in the first system while the second system does not used a support. 10% of previously prepared inoculum was used for both systems with 1,5 L of fermentation medium. After 8 hours, 1.5 L of soybean oil was included as an extraction solvent, and started taking samples every hour; thus, for both

systems 12 samples were obtained. The amount of bioethanol 1.5G production in both the aqueous phase and the extraction solvent were determined for all samples. For unsupported fermentation system it was obtained 19,9102 +/-0,6031 g/L of bioethanol 1.5G in the aqueous phase and 6,2 g/L of bioethanol 1.5G in soybean oil used as extraction solvent. On the other hand, the yield of bioethanol 1.5 G in the fermentation system with support was 23,9569 +/- 1,0591 g/L in the aqueous phase and 20 g/L in soybean oil used as extraction solvent. Efficiencies of 39,9972% and 67,3359% for the fermentation systems without support and with support were obtained, respectively. Thus it was concluded that the use of immobilization support is critical in the production of bioethanol 1.5 G by fermentation.

Keywords: Bioethanol 1.5 G , *Kluyveromyces*, immobilization support, extraction solvent.



ABREVIATURAS

t: Tiempo

K: Cepas de *Kluyveromyces* spp.

SF: Sistema de Fermentación

CB: Concentración de Bioetanol

PB: Producción de Bioetanol

CLR: Concentración de Lactosa Residual

B: Biomasa

ATT: Acidez Titulable Total

H: Humedad

ST: Sólidos Totales

ρ : Densidad

LR: Lactosa Residual

TSI: Agar Triple azúcar hierro

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La necesidad de investigación y búsqueda de combustibles alternativos van aumentando en todo el mundo debido a la escasez de fuentes de energía de origen renovable. El bioetanol también conocido como alcohol etílico no es sólo el producto clave en la producción de bebidas alcohólicas, sino también tradicionalmente empleado como material de alimentación química para un variedad de productos químicos industriales, tales como acetaldehído, ácido acético, acetato de etilo y butadieno. En los últimos años, se están desarrollando técnicas de obtención de combustibles líquidos y químicos de forma sustentable y utilizando materias primas de bajo costo como el lactosuero. El bioetanol tiene características positivas para ser utilizado como combustible a gran escala, debido a que su precio es relativamente bajo, emite menos contaminación y es obtenido a partir de procesos de fermentación. Las levaduras son los únicos organismos que actualmente se utilizan a gran escala en la producción industrial de etanol. La producción de bioetanol por fermentación es uno de los temas más populares en el mundo. Sin embargo, la fermentación alcohólica se limita debido a ciertos inconvenientes tales como la baja productividad, la baja densidad celular, efectos inhibidores tanto de sustrato y producto. La solución a este tipo de limitaciones es la fermentación extractiva. Este tipo de fermentación se ha desarrollado para eliminar el etanol presente en el medio de cultivo producto de la fermentación, permitiendo así la fermentación de carbohidratos sin inhibición del producto. Otra de las alternativas para mejorar la producción de bioetanol es el uso soportes de inmovilización ya que varios estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres. El incremento en la actividad metabólica, puede deberse a diferentes factores; afirman que gracias al incremento de la biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento.

Para aprovechar el lactosuero generado por las industrias lácteas en nuestro país, el presente trabajo de investigación tiene por finalidad evaluar la capacidad de producción de etanol por cepas aisladas de kéfir, utilizando dos sistemas de fermentación, el primer sistema de fermentación sin soporte de inmovilización y el segundo sistema con soporte de

inmovilización utilizando pepas de aceituna como soporte y aceite de soya como solvente de extracción.



HIPÓTESIS

Debido a que el lactosuero de origen industrial presenta en su composición lactosa, es posible que *Kluyveromyces spp.* sea capaz de transformar la lactosa presente en el lactosuero a bioetanol 1.5G utilizando como soporte de inmovilización pepas de aceituna y como solvente de extracción aceite de soya para mejorar significativamente la cinética de producción de bioetanol 1.5G en un ambiente artificial Batch.



OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto del uso de un soporte de inmovilización para la producción de bioetanol 1.5G a partir de lactosuero por un consorcio de *Kluyveromyces spp.* Aislados de kéfir empleando un solvente extractivo en un reactor batch.

Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente muestras de kéfir y lactosuero.
- Aislar y caracterizar bioquímica y funcionalmente cepas de *Kluyveromyces spp.* aisladas de muestras de kéfir.
- Evaluar, comparar la cinética microbiana de las cepas aisladas y seleccionar aquellas que demuestren mayor capacidad productiva de bioetanol 1.5G.
- Validar la determinación de bioetanol 1,5G utilizando técnica electroquímica emergente denominada VOLTAMETRÍA LINEAL.
- Comparar la capacidad de producción de bioetanol 1.5G entre los sistemas de fermentación con soporte y sin soporte utilizando pepas de aceituna como soporte de inmovilización y aceite de soya como solvente extractivo.

VARIABLES DE ESTUDIO

Las variables de estudio de esta investigación se presentan en las Tabla N°1 y Tabla N°2

Tabla N°1

Variables Independientes

Variable	Abreviatura	Indicador
Tiempo	T	Horas
Cepas de <i>Kluyveromyces spp.</i>	K	CPIT*
Sistema de Fermentación	SF	CS SS

* C: cepas lisas (L) o cepas granuladas (G); Pl: número de placa; T: tamaño de las cepas pequeñas (a) o grandes (b).

** CS: con soporte; SS: sin soporte.

Tabla N°2

Variables Dependientes

Variable	Abreviatura	Indicador
Concentración de Bioetanol	CB	g/L
Producción de Bioetanol en el Sistema	PB	g/L
Concentración de Lactosa residual	CLR	g/L

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 *Kluyveromyces spp.* y cepas microbianas fermentativas productoras de etanol

Existen aproximadamente 60 géneros y 500 especies ⁽¹⁾; su forma predominante es la unicelular; su reproducción vegetativa, puede ser por gemación o por fisión ⁽²⁾.

Las levaduras tienen una gran aplicación en el campo de la biotecnología y presentan grandes diversidades entre sí. La tecnología actual puede proporcionar etanol a partir de la fermentación de biomasa ⁽³⁾, donde esta vía biotecnológica, envuelve la acción de la levadura sobre un sustrato. Las levaduras que asimilan aeróbicamente la lactosa son comunes, sin embargo aquellas que fermentan lactosa son más raras, incluyendo por ejemplo *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida pseudotropicalis* ⁽⁴⁾.

Las levaduras son clasificadas por dos criterios:

- ✓ Convencionales o No Convencionales
- ✓ Crabtree-positivas (preferencialmente fermentadoras) o Crabtree-negativas (preferencialmente respiradoras) en esta clasificación *S. cerevisiae* es una levadura convencional- Crabtree-positivas ⁽⁵⁾ y *K.marxianus*, es de tipo Crabtree-negativa.

Con base en la clasificación de levaduras, se sabe que el microorganismo *Kluyveromyces marxianus* es una levadura ascospórica, pertenece al grupo de los Eumycota del tipo Hemiascomycetes que se encuentra dentro de la clase Ascomycotina. Es del orden Endomycetales; de la familia Saccharomicetaceae y subfamilia Saccharomycetoideae; del género *Kluyveromyces* y de la especie *marxianus*.

Produce de 1 a 4 ascosporas, su forma va de reniforme a media luna, puede fermentar glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, D-xilosa e inulina. No asimila nitrato. Crece a 37 °C ⁽⁶⁾.

La asimilación de la lactosa como fuente de carbono por levaduras del género *Kluyveromyces*, es una característica que está ausente en *S. cerevisiae* ⁽⁷⁾. *K. marxianus* es capaz de realizar la conversión directa de la lactosa en etanol, gracias a la actuación de una permeasa específica (lactosa-permeasa), codificada por el gen LAC12, este sistema asocia el transporte de una molécula de lactosa con el de un H⁺. El flujo de H⁺ es generado por una ATPasa adjunta a la membrana plasmática en el interior de la célula; realizando la fermentación de ese azúcar ya que tienen la capacidad de producir la enzima β -galactosidasa, que hidroliza lactosa en glucosa y galactosa.

Todavía esta levadura presenta problemas de inhibición por etanol. *K. lactis* es una de las especies más estudiadas, es considerada el organismo modelo del género *Kluyveromyces* ⁽⁸⁾, sin embargo *K. marxianus* ha sido estudiado en los últimos años por causa de sus ventajas en potencial biotecnológico. De esta forma esta levadura ha sido aceptada por las industrias porque posee características que son deseables para las aplicaciones biotecnológicas. *K. marxianus* es una levadura respiro-fermentativa, generando energía a través del ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico) o por fermentación en etanol. En contraste con *S. cerevisiae*, las levaduras respiro-fermentativas no exploran plenamente su capacidad de captación de glucosa durante el crecimiento oxidativo. Sobretudo *K. marxianus* es capaz de realizar simultáneamente fermentación y respiración, siendo el equilibrio entre estas dos vías depende de la especificidad de la estirpe ⁽⁹⁾. Es también un organismo termotolerante. Se diferencia de *S. cerevisiae* principalmente en cuanto al uso preferencial de la vía respiratoria de obtención de energía, sobre la fermentativa ⁽⁸⁾. La fermentación aerobia y anaerobia por la levadura *K. marxianus* en el tratamiento de reducción del potencial contaminante del suero y también para la obtención de productos como proteínas celulares, enzimas, biomasa microbiana y etanol ⁽¹⁰⁾.

Una ventaja significativa de *K. marxianus* consiste en su capacidad para crecer y fermentar a temperaturas elevadas (40°C) una propiedad que permite la reducción de costos (principalmente debido al costo reducido de refrigeración) en bioprocesos de producción de etanol. Se ha reportado que *K. marxianus* es capaz de crecer en condiciones aerobias a 52°C en lactosa y permeado de suero ⁽¹¹⁾.

2.2. Kéfir

El kéfir es una bebida láctea fermentada artesanal viscosa, de sabor ácido, levemente efervescente y con un aroma característico ⁽¹²⁾. Es producida por fermentación de leche con gránulos de kéfir. La leche fermentada contiene bacterias como *Lactobacillus kefir*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, también levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como, levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*) ⁽¹³⁾, que crecen en una estrecha relación específica; produciéndose durante la fermentación ácido láctico y alcohol.

Los gránulos de kéfir resultan ser masas gelatinosas, irregulares, color blanco o ligeramente amarillento, y consistencia elástica. Su tamaño es variable oscilando desde pocos milímetros a 2 o 3 centímetros de diámetro y su forma semejante a las inflorescencias de coliflor.



Figura N°1. Gránulos de Kéfir.

Es una asociación de bacterias y levaduras, no patógenas, unidas por una matriz polisacárida, denominada kefirán, producida por los microorganismos que viven en estrecha simbiosis adaptándose constantemente a los cambios ambientales y manteniendo un equilibrio constante ^(14,15). En los gránulos, se encuentran inmersas bacterias ácido lácticas (108-109 UFC/g de gránulo), levaduras (107-108 UFC/g de gránulo) y bacterias ácido acéticas (105-106 UFC/g de gránulo) ^(16,12).

Cuando los gránulos de kéfir son adicionados a la leche, parte de los microorganismos pasan a ella donde se multiplican y producen metabolitos que otorgarán a la leche fermentada sus

características químicas y físicas particulares. La composición del kéfir, así como sus características organolépticas están sujetas a variaciones regionales. Está documentado que éstas variaciones pueden deberse a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos de kéfir, el tipo leche utilizada, así como a las condiciones de elaboración del producto siendo relevantes la relación gránulo-leche y la temperatura de fermentación ⁽¹⁷⁾.

La composición microbiológica del kéfir es compleja y se han aislado una gran variedad de microorganismos tanto de estos como de la leche fermentada (Tabla N° 3)

Los gránulos de kéfir están constituidos tanto por levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exigus*)” ⁽¹⁸⁾.

Los gránulos se forman solamente a partir de otros gránulos preexistentes y en el laboratorio no ha sido posible formar un nuevo gránulo partiendo de la asociación de cepas aisladas de los mismos ⁽¹⁹⁾. Se cree que los gránulos se originaron debido a prácticas de las tribus de la región del Cáucaso, quienes dejaban fermentar la leche en odres hechos de estómago de animales donde la transportaban.

Sin llegar a consumir totalmente el producto, el saco era nuevamente recargado con leche, repitiendo el proceso durante mucho tiempo. Esta práctica puede haber permitido la reunión de los microorganismos y formación de la asociación simbiótica propia del kéfir ⁽¹⁹⁾.

Por poseer levaduras fermentadoras de lactosa, se ha sugerido el empleo de gránulos de kéfir en la producción de alcohol a partir de suero ^(20,21).

Tabla N°3. Microbiota típica aislada de los gránulos de Kéfir ⁽¹⁾

GENERO	ESPECIE	
Lactobacillus	Lb. acidophilus, Lb. brevis, Lb. casei subsp. alactosus, Lb. casei subsp. casei, Lb. casei subsp. Rhamnosus, Lb. cellobiosus, Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus, Lb. delbrueckii subsp lactis, Lb. fermentum, Lb. fructivorans, Lb. Gasseri, Lb. helveticus subsp. Lactis, Lb. hilgardii, Lb. kéfir, Lb. kefiranofaciens subsp. kefirgranum,	
Lactobacillus	Lb. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens, Lb. paracasei subsp. paracasei, Lb. parakefiri, Lb. plantarum, Lb. viridescens.	
Streptococcus	S. lactis, S. thermophilus.	
Lactococcus	Lc. lactis subsp. cremoris, Lc. lactis var. diacetylactis, Lc. lactis subsp. lactis.	
Levaduras	<i>Kluyveromyces spp.</i>	Kluyveromyces lactis var lactis, K. marxianus var. marxianus, Issatchenkia occidentalis, K. bulgaricus, K. fragilis/marxianus.
	<i>Saccharomyces spp.</i>	Saccharomyces carlsbergensis, S. cerevisiae, S. exiguous, S. lactis, Saccharomyces subsp. torulopsis holmii, S. turicensis sp. nov, S. unisporus.
Enterococcus	Enterococcus durans.	
Leuconostoc	Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris, L. mesenteroides subsp. mesenteroides.	
Acetobacterias	Acetobacter aceti, A. rasens	

⁽¹⁾Lopitz-Otsoa y col ⁽¹⁵⁾

La leche fermentada con gránulos de kéfir es una bebida refrescante, presenta burbujas debido al CO₂, con sabor ligeramente ácido o agrio, con un suave aroma similar a la levadura fresca. ⁽¹⁴⁾. Dentro de sus características fisicoquímicas tenemos que contiene 0.03% a 1.8% de alcohol, además de compuestos aromáticos como el acetaldehído y el diacetilo que contribuyen a su sabor único y aroma agradable, especial de este tipo de leche fermentada ⁽¹⁵⁾.

Presenta una consistencia más fluida que el yogurt. Esto quiere decir que la cuajada que se forma cuando se fermenta la leche se fragmenta muy fácilmente en partículas muy pequeñas, mientras que el cuajo del yogurt se mantiene cohesionado, o se deshace en pedazos, facilitando su digestión, por presentar una mayor superficie de contacto.

El polisacárido en donde se agrupan los microorganismos es un polímero ramificado moderadamente regular, su unidad de repetición consiste en tres moléculas de glucosa y tres de galactosa, (Figura N°2.), es soluble en agua y tiene textura viscosa ⁽²²⁾.

La leche fermentada con gránulos de kéfir contiene 0.2 a 0.7% del kéfirán producido por los gránulos de kéfir, durante el proceso de fermentación.

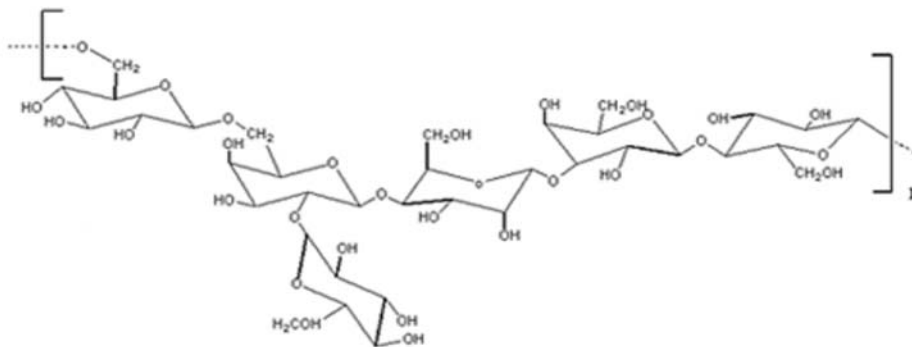


Figura N° 2. Estructura química de kéfirán ⁽²³⁾

Usando menos proporción de leche durante la fermentación, esta sustancia puede estar más concentrada en el producto final, este componente junto a las levaduras contribuyen a la particular textura única, rica y cremosa de la leche fermentada con gránulos de kéfir.

En el intercambio entre la leche y los gránulos de kéfir se produce una doble fermentación en la que se transforman los azúcares y proteínas de la leche en:

- CO₂ y etanol, producido por el metabolismo de las levaduras y BAL heterofermentativas.
- Ácido acético; muchos *Lactobacillus* producen diacetilo.
- Ácido láctico; producido por el metabolismo de las BAL, que reducen y transforman la lactosa (el azúcar de la leche), en ácido láctico, responsable de su acidez (pH de 4.2 a 4.6).
- Proteínas coaguladas. Transforma la caseína y la albúmina.

El kéfir presenta propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a la presencia de una microbiota compleja así como a sus productos metabólicos. Dentro de estos productos se pueden mencionar: ácidos orgánicos, vitaminas (fundamentalmente del grupo B), etanol, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo, proteínas de superficie de algunos microorganismos que se liberan al medio (capa S), y un exopolisacárido (kefirán) ⁽²⁴⁾.

2.3.Lactosuero

El lactosuero se define como la parte líquida que queda después de separar la cuajada al elaborar el queso. Representa alrededor del 85% al 90% del volumen de leche usada en la transformación

De los productos lácteos es el que contiene la mayor parte de los compuestos solubles y una pequeña parte de los compuestos insolubles de la leche, lo que representa aproximadamente la mitad de los sólidos totales.

El lactosuero es rico en lactosa, aminoácidos, vitaminas y proteínas solubles muy nutritivas. No obstante tiene un contenido muy elevado de agua. Adicionalmente presenta cantidades variables de minerales, ácido láctico y nitrógeno no proteico ⁽²⁵⁾.

En la elaboración de quesos, aproximadamente el 90% en peso es lactosuero y el 10% restante se convierte en queso. La composición del lactosuero varía con la leche utilizada y con el tipo de queso a fabricar, además depende del sistema de coagulación.

La composición del lactosuero varía de acuerdo a las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso del que proceda; a grandes rasgos, contiene 4.9% de lactosa, 0,9% de proteína cruda, 0,6% de cenizas, 0,3% de grasa, 0,2% de ácido láctico y 93,1% de humedad⁽²⁶⁾.

Se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes. Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5-5% p/v), proteínas solubles (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco) 0,6% de cenizas, 0,3% de grasa, 0,2% de ácido láctico y 93,1% de humedad. ⁽²⁶⁾.

Presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico ⁽²⁷⁾.

- a) Proteínas: El lactosuero contiene alrededor del 20% de las proteínas de la leche, siendo su principal componente la β -lactoglobulina con cerca de 10% y α -lactoalbúmina con 4% de toda la proteína láctea, además, contiene otras proteínas como albúminas séricas, proteopeptonas, inmunoglobulinas y otras⁽²⁸⁾.
- ✓ α -Lactoalbúmina: Contiene un 25% del total de la proteína del suero. El alfa-lactoalbumina es adicionado a fórmulas infantiles para hacerlas similares al patrón aminoacídico de la leche humana. Por su alto contenido de aminoácidos de cadenas ramificadas es utilizado también en suplementos para deportistas ⁽²⁹⁾.
- ✓ β -Lactoglobulina: Es la proteína soluble más abundante en la leche de vaca, posee un peso molecular cercano a los 18 kD y suele formar dímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas iguales ⁽³⁰⁾.
- ✓ Albúmina Sérica: Es un componente del lactosuero idéntico a la seroalbúmina sanguínea, misma composición en aminoácidos, mismo peso molecular (69.000), las mismas propiedades electroforéticas y magnéticas, y la misma cinética de

desnaturalización térmica. Está formada por una cadena peptídica única con numerosos repliegues estabilizados por puentes disulfuro ⁽³¹⁾.

- ✓ Proteopeptonas: Constituyen una fracción compleja formada por una mezcla heterogénea de polipéptidos que permanecen solubles después del calentamiento de la leche a 95 C durante 20-30 minutos con una acidificación a pH 4.6.
- ✓ Inmunoglobulinas y otras proteínas: Las inmunoglobulinas o gamma globulinas representan aproximadamente el 10% del total de las proteínas del lactosuero ⁽³²⁾.

Otras proteínas contenidas en el suero son las denominadas metaloproteínas, al tener la capacidad de fijar específicamente y de forma reversible hierro y cobre. Entre ellas se encuentran las siguientes: *Lactoferrina*, *Transferrina* y *Ceruloplasmina*

- b) Lactosa: Es el azúcar presente en la leche de la mayoría de los mamíferos. Es un disacárido formado por galactosa y glucosa y se define químicamente como O - β - D - galactopiranosil - (1-4) - β - D-glucosa, C₁₂H₂₂O₁₁ ^(33,34) con un peso molecular de 342 g/g-mol. Existe como dos formas isómeras: α y β, que se diferencian únicamente en la posición de un grupo -OH en el carbono C1 de la glucosa (isomería ciclánica) (Figura N°3.) ⁽³⁵⁾.

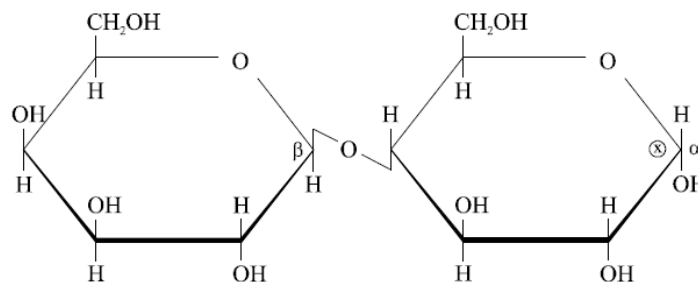


Figura N°3. Estructura molecular de la lactosa³⁵

Al hidrolizarse, la lactosa libera glucosa y galactosa, cuyo poder edulcorante combinado es de aproximadamente el 80% del de la sacarosa. Este hidrolizado es también unas 3 o 4 veces más soluble que la lactosa y además, los monosacáridos son absorbidos fácilmente en forma directa por la mucosa digestiva ⁽³⁵⁾.

La lactosa es considerada el principal carbohidrato de la leche y es uno de los principales componentes del lactosuero. Es una fuente de energía de gran importancia para los niños en sus primeros años de vida, siendo el responsable de suministrar hasta el 50% de la necesidad energética en los niños ⁽³⁶⁾. La lactosa del suero de queso es generada en grandes cantidades, donde nueve litros de suero por 1 kg de queso producido generan cerca de 0,45 Kg de lactosa ⁽³⁷⁾.

La industria láctea produce grandes cantidades de lactosa y parte de ella es recuperado durante el proceso. Sin embargo, una gran cantidad de lactosa no es recuperada y, finalmente, se convierte en un problema en la eliminación de residuos.

Para que la lactosa pueda ser absorbida por el cuerpo humano debe ser hidrolizado en el intestino por la enzima lactasa (β -D-galactosidasa). La lactasa hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa ⁽³⁶⁾. La lactosa se puede hidrolizar mediante ácidos fuertes, resinas de intercambio iónico o por enzimas, siendo este último método el que asegura un proceso de hidrólisis sin afectar los otros componentes presentes en la leche. La enzima utilizada para dicha hidrólisis se denomina β -Galactosidasa o más comúnmente lactasa. La β -Galactosidasa es también conocida como lactasa porque utiliza lactosa como sustrato. La β -Galactosidasa cataliza la reacción de hidrólisis de los residuos terminales no reducidos de β -D-galactosa en compuestos β -D-galactósidos.

La β -Galactosidasa puede obtenerse de diversas fuentes, pero su producción a escala industrial para aplicaciones en la industria alimenticia, solamente se realiza mediante el cultivo de microorganismos considerados seguros por organismos internacionales, tales como las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis* y los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* ⁽³⁸⁾. La lactasa de *Escherichia coli* no es utilizada en el procesamiento de alimentos debido a su costo de producción y problemas de toxicidad al utilizar extractos crudos de coliformes. Aunque no existe un conocimiento acabado de la estructura de las distintas enzimas β -Galactosidasa, se dispone de un trabajo muy importante para la aproximación de la lactasa de la levadura de la leche *Kluyveromyces lactis* que puede utilizarse como base para predecir posibles alteraciones químicas en el medio de trabajo. En

esta enzima, los 1025 aminoácidos que componen la cadena³⁹ se pueden clasificar como se muestra en la Tabla N° 4.

Tabla N°4.: Composición de aminoácidos presentes en la enzima β -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis sp* ⁽¹⁾

Aminoácido	N° de unidades	Porcentaje
No polares		
Alanina (Ala)	51	5,0
Valina (Val)	72	7,0
Leucina (Leu)	76	7,4
Isoleucina (Ile)	56	5,5
Prolina (Pro)	50	4,9
Metionina (Met)	9	0,9
Fenilalanina (Phe)	57	5,6
Triptofano (Trp)	19	1,9
Polares, neutros		
Cisteína (Cys)	7	0,7
Glicina (Gly)	68	6,6
Serina (Ser)	63	6,1
Treonina (Thr)	48	4,7
Tirosina (Tyr)	54	5,3
Asparagina (Asn)	59	5,8
Glutamina (Gln)	27	2,6
Polares ácidos		
Ac. Aspártico (Asp)	75	7,3
Ac. Glutámico (Glu)	81	7,9
Polares, básicos		
Arginina (Arg)	34	3,3
Histidina (His)	38	3,7
Lisina (Lys)	81	7,9

⁽¹⁾ ExPASy, 1999³⁹

Del análisis de la composición de aminoácidos presentada en la Tabla N° 4., se puede establecer para esta β -Galactosidasa un peso molecular de 117.618,78 Da.

Cualquiera sea el origen de la enzima, el mecanismo de reacción aceptado considera la formación de un complejo [enzima-sustrato] a través de la interacción de la galactosa con el sitio activo de la enzima. A partir de esto, se libera primero la glucosa y luego puede separarse la galactosa o la reacción del complejo [enzima-galactosa] con un mono o disacárido para producir un di u oligosacárido (8-9). La galactosa, como producto de hidrólisis, puede interactuar nuevamente con el sitio activo de la enzima, compitiendo por el mismo con la lactosa (40). Este mecanismo se conoce como inhibición por producto.

La composición del suero de queso no sólo depende de las particularidades del proceso de elaboración, sino también de la composición de la leche cruda. Existen dos tipos de lactosuero que son:

- ✓ **Lactosuero Ácido:** Se define como el producto de la fabricación de quesos de pasta fresca y pasta blanda así como de la fabricación de caseína láctica (41) contiene lactato de calcio, se sabe que cuando la coagulación es realizada por el cuajo el complejo de caseína –calcio se desdobra en paracaseinato de calcio y proteínas del lactosuero permaneciendo en este caso el calcio unido a las proteínas coaguladas, en un medio ácido, el calcio se separa de la fosfocaseína y aparece en gran cantidad en el lactosuero. Estos sueros tienen una acidez de 0,18 a 0,25% de ácido láctico (42), los sueros de quesería se denominan ácidos cuando poseen valores de pH igual o inferior a 5,0 (42). Su contenido en extracto seco varía entonces entre el 4,5 y el 5,0%. (43)
- ✓ **Lactosuero Dulce:** Son producidos por otros tipos de queserías (pasta prensada y pastas cocidas) y por los fabricantes de caseínas al cuajo. El lactosuero dulce, por carecer de calcio, no puede formar lactatos y aunque se someta a una acidificación no puede transformarse en lactosuero ácido (42). En la Tabla N°5. muestra la composición de los dos diferentes tipos de lactosuero. Presentan un pH superior a 5,0. (44)

Tabla N°5: Composición media del lactosuero ⁽¹⁾

PARÁMETROS	LACTOSUERO DULCE (%)	LACTOSUERO ÁCIDO (%)
Agua	93 – 95	93-95
Extracto Seco	5 – 7	5 – 7
Lactosa	4,5 – 4,3	3,8 – 5,2
Proteínas	0,6 – 1,1	0,2 – 1,1
Grasa	0,1 – 0,4	0,1 – 0,5
Sales Minerales	0,5 – 0,7	0,5 – 1,2
Ácido Láctico	0,1 – 0,2	0,2 – 1,2
Cloruros	0,15- 0,6	0,16 – 0,6
Finos	0,05 – 0,3	0,05 – 0,3

⁽¹⁾Spreer, 1991⁽⁴⁵⁾

Entre los aspectos ambientales el lactosuero representa un problema ambiental importante por los grandes volúmenes producidos y por su alta demanda química de oxígeno 60,000-80,000 mg/L. La solución a este problema de contaminación ha tenido una urgente atención debido al incremento en los volúmenes de suero producido, la centralización de las plantas y los requerimientos legislativos estrictos de los países⁽⁴⁶⁾.

Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental, debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto ⁽⁴⁷⁾.

La lactosa constituye una alta proporción (> 75 %) de los sólidos de suero y contribuye en gran parte a que el suero sea considerado uno de los alimentos más contaminantes del medio

ambiente debido a que su demanda bioquímica de oxígeno es mayor a 35000 ppm y la demanda química de oxígeno supera las 60000 ppm ⁽⁴⁶⁾.

De esta forma, anualmente se generan grandes cantidades de suero, lo que implica graves problemas para su eliminación como así también la pérdida de hidratos de carbono. En nuestro país se desechan anualmente más de 2.000,000 de litros de suero que poseen una demanda biológica de oxígeno (DBO) de aproximadamente 35.000 mg O₂/lt de suero. La problemática es tal que verter un litro de suero supone la muerte por asfixia de todos los peces contenidos en 10 toneladas de agua.

La distribución de la producción de lactosuero en el mundo en el año 2005 fue: Europa 53%, América del Norte y central 28%, Asia 6%, África 5%, Oceanía 4%, América del Sur 4% ⁽⁴⁸⁾, anualmente estos porcentajes representan 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero son producidas a nivel mundial a través de la elaboración de queso ⁽⁴⁹⁾, de este valor, el 45% se desechan en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales, o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes ocasionando serios problemas de contaminación ⁽⁵⁰⁾. El porcentaje restante es tratado y transformado en varios productos alimenticios, de los cuales cerca del 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en polvo, 15% como lactosa y subproductos, y el resto como concentrados de proteína de lactosuero ⁽⁵¹⁾.

Debido a la legislación vigente que prohíbe el volcado de efluentes de alta carga orgánica sin tratamiento previo a los cursos de agua, inicialmente parte del suero se suministraba a los animales en granjas en reemplazo del agua y parte se arrojaba sobre el campo pero se ocasionaron problemas tales como trastornos digestivos, dado la falta de hábito de los animales para consumir un producto con elevado contenido de lactosa o problemas tales como contaminación ambiental, ya que con la formación de charcos se produce mal olor y presencia de insectos, o se puede elevar la acidez del suelo.

Surge así la necesidad de implementar metodologías de tratamiento del suero como efluente o deshidratarlo para usos posteriores, pero los costos de instalación y los demandados para

eliminar grandes volúmenes de agua hacen también difícil esta operación. Sumado a ello, los grandes volúmenes de suero producidos superan la capacidad de las plantas de secado, y por lo tanto el suero actualmente es directamente eliminado como efluente.

2.4.Rutas Metabólicas para la obtención de Bioetanol

a) Fermentación Alcohólica:

Es una alternativa interesante para la biorremediación del permeado contaminante que queda después de la separación de las proteínas de suero de leche. La fermentación de la lactosa de suero de leche a etanol, particularmente el uso de levaduras, se ha hecho referencia frecuentemente en la literatura, por lo menos desde la década de 1940⁽⁵²⁾. Aunque las levaduras que asimilan la lactosa aeróbicamente están muy extendidas, los que la lactosa fermento son bastante raros⁽⁵³⁾, incluyendo por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, y *Candida pseudotropicalis*.

b) Fermentación de Lactosa a Bioetanol:

La fermentación es la principal vía para la obtención de etanol ya que la lactosa es la fuente bioquímica de obtención de energía. La fermentación de la lactosa del suero de queso a etanol, usando levaduras ha sido estudiada frecuentemente desde 1940⁽⁵²⁾.

La fermentación ocurre debido a que las células producen la energía necesaria para sobrevivir, mediante fenómenos de degradación de la materia orgánica: la respiración que necesita de oxígeno o la fermentación que ocurre en la ausencia de oxígeno.

La fermentación alcohólica consiste en un conjunto de reacciones bioquímicas donde la levadura necesita transformar mucho azúcar en alcohol, para asegurar sus necesidades. Eso ocurre a partir de tres factores fundamentales: presencia de azúcares, microorganismos que sean capaces de transformar el azúcar en etanol y gas carbónico en ausencia de oxígeno, debe

ser rápida a fin de maximizar la productividad del proceso. Se debe minimizar la concentración de azúcar del efluente, la finalidad del proceso es normalmente el tratamiento de residuos.

En la fermentación realizada por el género *Kluyveromyces spp.* la lactosa es transportada por una permeasa codificada por el gen LAC12 introducido tanto por lactosa y galactosa. Después del transporte la lactosa es hidrolizada por la enzima β -galactosidasa, también introducida por la lactosa, siendo codificada por el gen LAC4, originando de esta manera glucosa y galactosa⁽⁵⁴⁾. La conversión enzimática se puede observar en la Figura N°4.

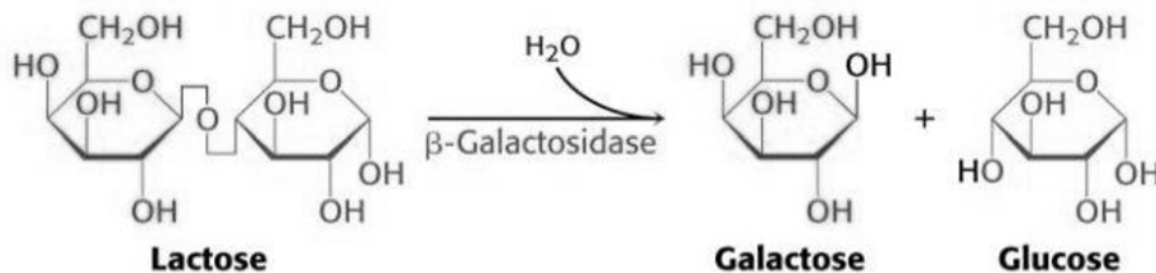


Figura N° 4. Conversión enzimática de la lactosa en glucosa y galactosa⁽⁵⁵⁾

Una vez hidrolizada la lactosa, la glucosa y la galactosa son fosforiladas antes de incorporarse a la vía glucolítica o de Embden-Meyerhof (EMP). La hexoquinasa cataliza el paso de glucosa a glucosa-6-fosfato, para lo que requiere ATP y Mg^{2+} ⁽⁵⁶⁾. La galactosa es fosforilada por la galactoquinasa y transformada en glucosa-6-fosfato antes de integrarse en la ruta EMP⁽⁵⁷⁾.

En función de la disponibilidad de oxígeno, puede cambiar el destino del piruvato, metabolito final de la ruta EMP, con distinto resultado en cuanto a rendimiento energético. En presencia de oxígeno, la piruvato deshidrogenasa convierte el piruvato en acetil-CoA, que se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs, que en conexión con la cadena respiratoria genera ATP, CO_2 y H_2O . Ante una limitación de oxígeno, sin embargo, se activa la piruvato decarboxilasa que media el paso de piruvato a acetaldehído, luego convertible en etanol, con menor rendimiento de CO_2 y nula producción de energía y agua. No sólo la concentración

de oxígeno encamina al piruvato por una u otra ruta; también influye en ello la cantidad de azúcares metabolizados, canalizados en la glucólisis. La piruvato deshidrogenasa tiene por el piruvato una afinidad 10 veces mayor que la piruvato decarboxilasa, por lo que capta preferentemente a este sustrato cuando su nivel es bajo, debido a un menor flujo glucolítico. Sin embargo, cuando este flujo aumenta, el piruvato se conduce en mayor proporción hacia la formación de etanol ⁽⁵⁸⁾, (Figura N°5).

Por lo que se refiere a la cadena de transporte electrónico, en las levaduras existen NADH deshidrogenasas localizadas en la superficie externa de la membrana mitocondrial que aceptan electrones del NADH o NADPH procedentes del exterior de la mitocondria, sin necesidad de un mecanismo especial (como en los organismos eucarióticos superiores) para transportar los coenzimas reducidos al interior de la mitocondria ⁽⁵⁹⁾.

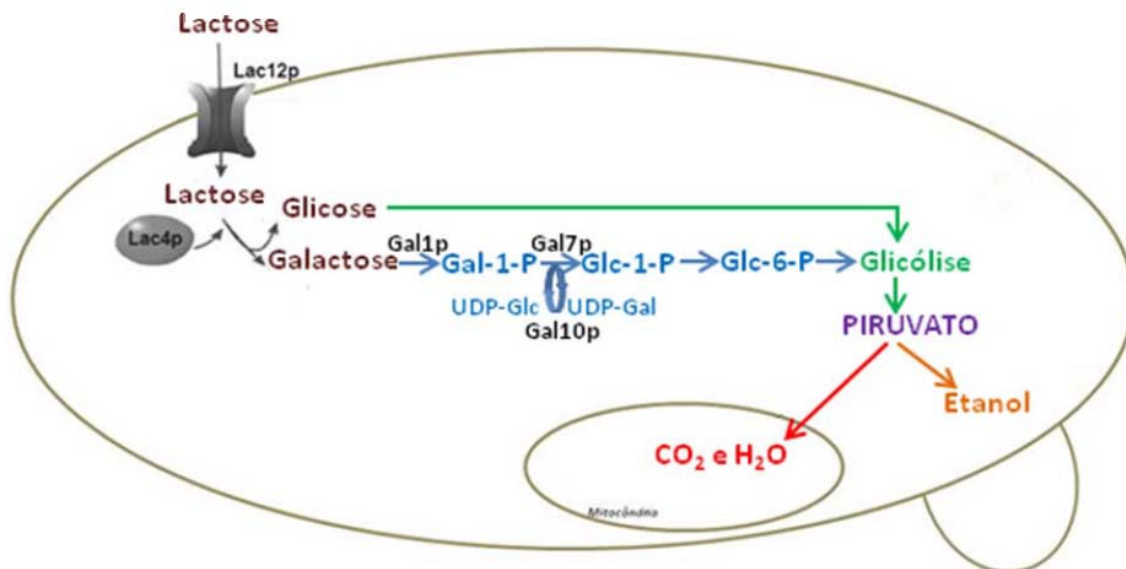


Figura N°5. Metabolismo de la lactosa ⁽⁶⁰⁾

c) **La Fermentación Extractiva:**

Es un proceso que combina la biorreacción y la extracción del producto principal de ésta, en un régimen continuo y de manera simultánea en el recipiente de fermentación. Es un proceso unificado muy promisorio para aumentar la producción de químicos como antibióticos, vitaminas, alcoholes, ácidos orgánicos y solventes.

Esta técnica ha encontrado aplicación en sistemas donde el crecimiento microbiano (y por ende la generación de producto) se ve inhibido por la concentración del producto en el fermentador, fenómeno conocido como inhibición por producto final, o por algún otro metabolito indeseable. La recuperación del producto por extracción es de particular interés para tales sistemas, ya que permite la remoción in situ del agente inhibidor ⁽⁶¹⁾.

La extracción se consigue generando una segunda fase con el uso del contacto continuo de un solvente orgánico inmiscible en el caldo de fermentación, que por lo general es de naturaleza acuosa. Esto provocará una menor concentración inhibidora del producto en el caldo, haciendo mayor la velocidad de reacción.

Adicionalmente, este proceso permitirá la fermentación de mezclas más concentradas en sustrato (debido a las altas velocidades de crecimiento celular, que se presentan al no existir inhibición por producto), disminución en los costos de recuperación de producto (la purificación se efectúa al extracto, no al caldo fermentado), en los costos de tratamiento de agua de desecho y en el consumo de energía (se emplea menos agua) ⁽⁶²⁾.

Ejemplos de fermentaciones inhibidas por el producto son:

- ✓ Fermentación alcohólica para la producción de etanol.
- ✓ Fermentación para la producción de Ácidos orgánicos (acético, láctico, butírico, etc.).
- ✓ Fermentación para la producción de polisacáridos, debida al aumento en la viscosidad del caldo, que dificulta la transferencia de masa.

Existe un método denominado extracción líquido-líquido, el cual separa los componentes basándose en la diferencia de solubilidades en dos disolventes inmiscibles. El caldo de

fermentación se pone en contacto con un solvente orgánico inmisible en agua y el componente de interés (etanol en este caso) se remueve parcialmente en el disolvente orgánico. La destilación se utiliza entonces para recuperar el componente de interés del solvente orgánico relativamente volátil. Esto puede reducir el costo de la recuperación de etanol como disolventes orgánicos, ya que entran en ebullición a temperatura relativamente baja en comparación con el agua y generalmente tienen una entalpía de vaporización menor que el agua ⁽⁶³⁾.

La extracción con solventes es ampliamente utilizado para la recuperación del producto en muchos procesos de fermentación ^(64,65).

La identificación del solvente adecuado es la principal desventaja o complejidad de esta técnica. El solvente a utilizar debe cumplir las características fisicoquímicas que se exponen en secciones subsecuentes y además, características biológicas que se relacionan con la biocompatibilidad, es decir, con el buen desempeño y supervivencia de los microorganismos durante el proceso de fermentación, cuando éstos entran en contacto con el solvente (así sea en mínimas cantidades).

Esta característica es tan importante debido a que se requiere un buen contacto entre el solvente extractor y el caldo, para asegurar la transferencia de masa sin recurrir a la separación de microorganismos antes de la extracción, ya que no resultaría económico en procesos a gran escala ⁽⁶⁶⁾.

Un solvente para uso en la extracción de etanol a partir de un caldo de fermentación debe tener idealmente:

- Un alto factor de separación para el bioetanol
- Una alta capacidad de etanol para minimizar el uso del solvente
- Un solvente de baja solubilidad en la fase acuosa para minimizar la pérdida de solvente
- Una suficiente diferencia de densidad entre la fase del solvente y la fase acuosa para permitir una rápida separación de fases
- Una buena estabilidad química
- Un punto de ebullición bajo (presión de vapor)

- Una baja toxicidad para los microorganismos fermentadores
- Un método eficaz para la recuperación de etanol a partir del solvente
- Un bajo costo

En su forma más simple, la extracción líquido-líquido implica agitación de dos fases juntas seguido de separación por gravedad. Las transferencias de soluto desde la fase acuosa a la fase del solvente. El solvente que contiene el soluto se procesa adicionalmente para recuperar el soluto. Para evaluar la factibilidad de la separación de etanol por extracción líquido-líquido (extracción con solvente), coeficiente de distribución o el coeficiente de partición de etanol necesita ser conocido.

Además, la selectividad del disolvente para el etanol puede ser importante, de manera que los otros componentes no se eliminan del caldo de fermentación por el disolvente.

Ácido oleico ha sido el solvente de elección en la mayoría de las fermentaciones extractivas. Esto es porque el alcohol oleico no es tóxico, tiene una muy alta selectividad relativa para el etanol, pero tiene un coeficiente de partición bajo (menos de 0,4). Un bajo coeficiente de partición significa que una gran cantidad de solvente debe ser utilizado para extraer eficientemente etanol a partir de los medios de fermentación; esto, por supuesto da como resultado una baja concentración de etanol en el solvente.

El Ácido láurico tiene una alta toxicidad para los microorganismos y una solubilidad relativamente alta en la fase acuosa. 2 - etil- hexanol es también un buen agente de extracción, ya que tiene una buena capacidad de separación de fases, un coeficiente de distribución de más de 0,4, un punto de ebullición alto y es relativamente barato ⁽⁶⁷⁾.

Recientemente, los aceites vegetales y sus derivados han sido investigados para su uso como agentes de extracción en las fermentaciones. El aceite de ricino tiene un alto coeficiente de distribución para el etanol en comparación con los otros aceites vegetales no tóxicos ⁽⁶⁷⁾. También se utilizó aceite de soya como solvente de extracción ⁽⁶⁸⁾.

- **Solvente de Extracción: Aceite de Soya**

La soya es uno de los productos más antiguos que el hombre conoce. Su planta pertenece a la clase Dicotyledoneae, subclase Archichlamydae, orden Rosales, suborden Leguminosinae, familia Leguminosae, subfamilia Papilionaceae, género *Glycine L.*, subgénero *Glycine (Moench)* e especie *Glycine max (L.)*. El grano posee textura suave, sabor amargo, elevados niveles de ácido ascórbico y β -Caroteno, con 17-19% de proteínas y 35-40% de aceites⁽⁶⁹⁾. Alrededor del 99% de triglicéridos presentes en el aceite de soya se componen de ácidos grasos, linolénico y esteárico, palmítico, linoleico oleico, como puede verse (Tabla N°6) Además, hay pequeñas cantidades de componentes no glicéridos tales como fitosteroles, ceras, hidrocarburos, carotenoides, tocoferoles y fosfátidos.

Tabla N° 6: Composición de Ácidos grasos del aceite de soya⁽¹⁾

Ácidos Grasos Saturados	N° de Carbonos	Concentración (%)
Laúrico	C 12:0	0,1 (max.)
Mirístico	C 14:0	0,2 (max.)
Palmítico	C 16:0	9,9 – 12,2
Esteárico	C 18:0	3 – 5,4
Araquídico	C 20:0	0,2 – 0,5
Behémico	C 22:0	0,3 – 0,7
Lignocérico	C 24:0	0,4 (max.)

Ácidos Grasos Insaturados	N° de Carbonos	Concentración (%)
Palmitoleico	C 16:1 (9)	Trazas – 0,2
Oleico	C 18:1 (9)	17,7 – 26
Linoléico	C 18:2 (9,12)	49,7 – 56,9
Linolénico	C 18:3 (9,12,15)	5,5 – 9,5
Gadoléico	C 20:1 (5)	0,1 – 0,3
Erúcico	C 22:1	0,3 (máx.)

⁽¹⁾Fuente: Embrapa⁽⁷⁰⁾

2.5. Soporte de Inmovilización

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada. Es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares ó a sustancias que estos mismos segregan. Bajo muchas condiciones las células inmovilizadas tienen ventajas sobre las células libres.

La estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada ⁽⁷¹⁾.

La inmovilización de microorganismos ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento de sistemas de tratamiento de aguas, suelos y aires contaminados. Algunos de los aspectos más importantes considerados en esta técnica son expuestos a continuación, así como algunas aplicaciones ambientales.

La inmovilización de diferentes microorganismos en diversos soportes que van desde los biodegradables como residuos orgánicos o agroindustriales, hasta aquellos de difícil o nula degradación como plásticos y fibras de vidrio han permitido el interés y el desarrollo de nuevas tecnologías debido a algunas ventajas que presentan como son:

- ✓ Concentración de biomasa.
- ✓ Actividad metabólica
- ✓ Resistencia a la toxicidad

Varios estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres. El incremento en la actividad metabólica, puede deberse a diferentes factores; afirman que gracias al incremento de la biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento ⁽⁷²⁾.

De igual forma debido a que tanto el soporte como la misma biopelícula que algunos de estos microorganismos forman, atrapan gran parte de los nutrientes y sustancias presentes en el medio, estos estarán más disponibles para las células inmovilizadas, que si estuvieran libres ⁽⁷³⁾. Al estar inmovilizados algunos microorganismos pueden “encender” genes específicos que permiten un incremento en el metabolismo de estos.

La inmovilización pasiva es un tipo de inmovilización en la que algunos microorganismos de forma natural tienden a formar aglomerados o unirse a superficies y crecer en ellas. Esta interacción con superficies puede darse por la presencia de estructuras celulares como la cápsula y las fimbrias en el caso de las bacterias, y en el caso de los hongos sus propias hifas.

Durante la inmovilización pasiva puede darse un proceso de formación de biofilms el cual tan solo de un 15 – 25% corresponde a células vivas. El porcentaje restante está compuesto por agua en su mayoría, exopolisacáridos (EPS), proteínas y ácidos nucleicos; estos 3 últimos compuestos son conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Son complejas estructuras, con sistemas de canales de agua y aireación, los cuales permiten el transporte de nutrientes, desechos, oxígeno, y agua, entre otros. Gracias a estos canales se generan diferentes gradientes de tensión de pH y oxígeno, lo cual permite que se desarrollen micronichos y diversos grupos bacterianos ⁽²⁰⁾.

Las matrices orgánicas tienen mayor adsorción de la que pueden brindar las matrices sintéticas. Esto se debe a que los materiales orgánicos tienen mayor cantidad de grupos radicales como amino, carboxil, entre otros; así como una mayor cantidad de nutrientes, lo cual permite una adherencia y crecimiento más eficaz ⁽⁷³⁾.

Para lograr una inmovilización que sea eficaz para el proceso a realizar, se deben tener en cuenta que los espacios que se usarán como soporte de inmovilización cumplan con ciertos parámetros tales como la presencia de una superficie de adherencia amplia, que sea de fácil operación y regeneración; debe tener buena porosidad con el fin de permitir un intercambio constante de sustratos, productos, gases, etc.; debe tener una buena estabilidad química, biológica, mecánica y térmica, así como resistente a enzimas, solventes ó cambios de presión ⁽²⁰⁾.

En cuanto a las células a inmovilizar, afirman que estas deben ser viables y deben mantener un metabolismo activo por periodos largos, así como su metabolismo no debe verse afectado por los procesos de inmovilización.

a) Hueso de Aceituna como Soporte de Inmovilización

El hueso de aceituna es uno de los residuos sólidos más importantes que genera la industria del olivar, por lo que se han encontrado algunas vías de aprovechamiento debido a sus grandes volúmenes de generación.

Teniendo en cuenta el elevado porcentaje que representa el hueso con respecto al total del fruto (entre 18 y 23 %), su aprovechamiento ha despertado la atención de numerosos investigadores en los últimos años. Es utilizado como soporte de inmovilización debido a su porosidad y superficie por la cual está compuesta. La composición se muestra en la Tabla N°7.

Tabla N°7. Composición elemental del hueso de aceituna ⁽¹⁾

Compuesto	Porcentaje (%)
Carbono	21,98
Cenizas	1,62
Humedad	13,12
Carbono	50,79
Hidrógeno	5,95
Nitrógeno	0,48
Azufre	0,04
Oxígeno	42,74

⁽¹⁾ Fuente: OPET 2002 ⁽⁷⁴⁾

2.6. Biocombustibles y Bioetanol

Los biocombustibles pueden definirse en general como de los combustibles sólidos, líquidos o gases y son por lo tanto distinguibles de los combustibles fósiles, que se derivan de fosilizado de un material biológico. En la actualidad, los biocombustibles más ampliamente producidos son el etanol, diesel y metanol. El bioetanol es el etanol (alcohol etílico) producido a partir de materias primas agrícolas a través de la acción microbiana. El bioetanol tiene el potencial para reemplazar los combustibles líquidos derivados del petróleo en algunas aplicaciones.

El bioetanol se puede producir de manera sostenible desde recursos renovables, tales como la celulosa, caña de azúcar, la melaza, la papa, el maíz y la cebada ⁽⁷⁵⁾. El bioetanol se está utilizando para desplazar los combustibles de petróleo, ya que tiene el potencial para reducir la emisión neta de dióxido de carbono, el principal gas de efecto invernadero. La producción de bioetanol utiliza la misma tecnología utilizada en las bebidas alcohólicas.

El etanol es de baja toxicidad, volatilidad y reactividad fotoquímica. Al combustionar produce dióxido de carbono y agua ⁽⁷⁶⁾.

El bioetanol es ampliamente utilizado como combustible en Brasil, Estados Unidos y algunos países europeos. Los mayores productores son Brasil (37 % de la producción mundial), EE.UU. (33 % de la producción mundial) y la Unión Europea con un 14% de la producción mundial.

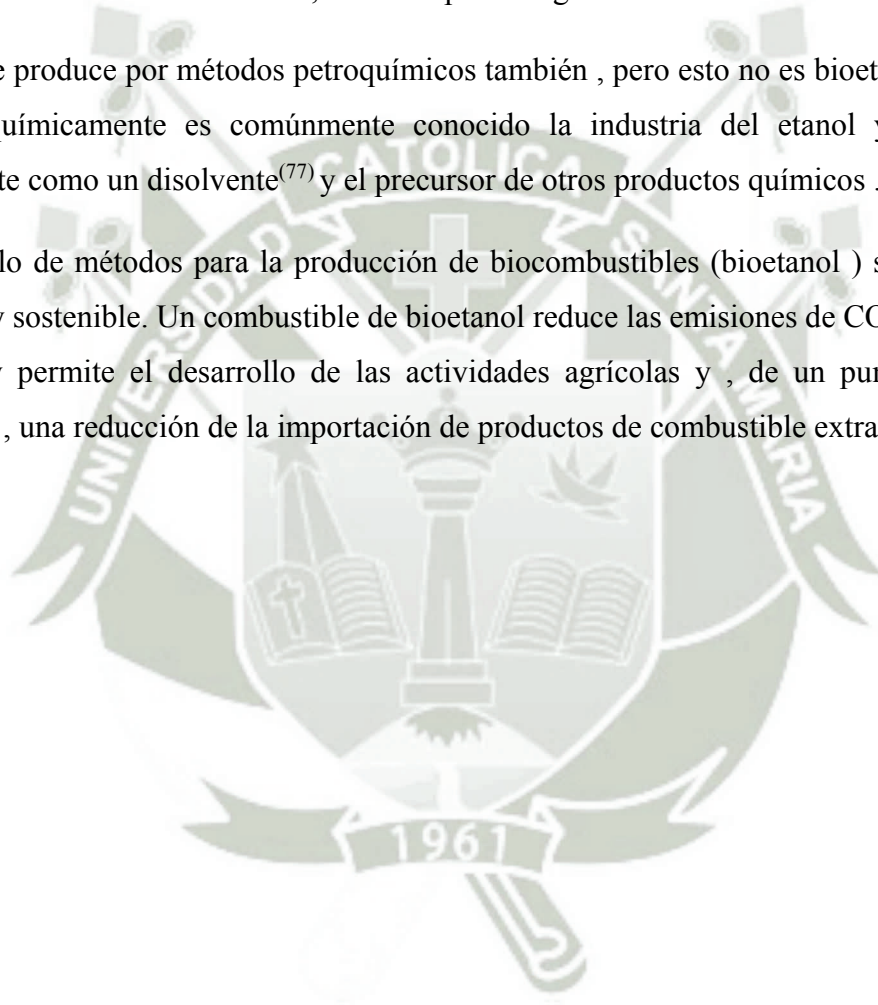
Hoy en día, la producción de etanol requiere un 50 por ciento menos de energía que lo hizo en la década de 1980. La tecnología de la producción de bioetanol está mejorando continuamente. Por ejemplo, el rendimiento de etanol a partir del maíz se ha incrementado en más de un 22 % en los EE.UU. en comparación a 1980.

a) Propiedades y usos de bioetanol:

Es un líquido incoloro con un olor y sabor característico. El grupo de compuestos químicos cuyas moléculas contienen un grupo hidroxilo, $-OH$ unido a un átomo de carbono. Tiene un punto de fusión de $-114.1^{\circ}C$, densidad de $0,789g/ml$ a $20^{\circ}C$ ⁽⁷⁷⁾. Con un punto de ebullición de $78,4^{\circ}C$. Es miscible con agua en todas las proporciones, y es difícil de separar del agua. El etanol puro es también conocido como etanol absoluto o etanol anhidro. El etanol forma una mezcla de ebullición constante, o azeótropo con agua ⁽⁷⁵⁾.

El etanol se produce por métodos petroquímicos también, pero esto no es bioetanol. Etanol derivado químicamente es comúnmente conocido en la industria del etanol y se utiliza ampliamente como un disolvente ⁽⁷⁷⁾ y el precursor de otros productos químicos.

El desarrollo de métodos para la producción de biocombustibles (bioetanol) se considera renovable y sostenible. Un combustible de bioetanol reduce las emisiones de CO_2 . También mantiene y permite el desarrollo de las actividades agrícolas y, de un punto de vista económico, una reducción de la importación de productos de combustible extranjero.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa y en el laboratorio de Electroquímica e Nanotecnología (LEN) del Instituto de Tecnología e Pesquisa (ITP), situado en el campus Aracaju-Farolândia de la Universidad de Tiradentes (UNIT) –Brasil.

3.2.MATERIALES

3.2.1. Material Biológico

Lactosuero ácido proveniente del queso parmesano, suministrado por empresa LAIVE S.A. (Parque Industrial, Calle Eduardo López de Romaña 112-AREQUIPA)

Kéfir artesanal.

3.2.2. Material de vidrio

- Frascos de Vidrio de boca ancha
- Probetas 100ml, 250ml
- Fiola 250ml
- Bureta 25 ml
- Picnómetro 50 ml
- Beaker 500ml
- Matraces 250ml, 500ml
- Bagueta

- Placas Petri 90x15mm
- Pipetas 1ml, 5ml, 10ml
- Láminas Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos de ensayo 13x100 mm, 16x150 mm, 20x150 mm

3.2.3. Reactivos

- Lactosa Q.P
- Maltosa Q.P
- Glucosa Q.P
- Galactosa Q.P
- Agar Saboraud Q.P-DIPROQUIM
- Peptona bacteriológica Q.P
- Extracto de levadura Q.P- DIPROQUIM
- Cloruro de Sodio Q.P- DIPROQUIM
- Cloruro de Magnesio Q.P
- Dicromato de potasio Q.P
- Sulfato de Magnesio Hepta Hidratado Q.P- DIPROQUIM
- Cloruro de Calcio Q.P
- Cloruro de potasio Q.P- DIPROQUIM
- Bicarbonato de Sodio Q.P
- Bromuro de Sodio Q.P

- Cloranfenicol 500 mg
- Penicilina
- Agar-agar
- Tinción de Gram
- Aceite de Inmersión
- Etanol 96% DIPROQUIM
- Fenol Q.P
- Alcohol isoamílico 98%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido Fosfórico 85%
- Hidróxido de Sodio Q.P
- Aceite de soya refinado FRIOL
- Leche UHT “GLORIA”

3.2.4. Equipos

- Incubadora P. SELECTA
- Autoclave FRAVILL AV-30
- Refrigeradora BOSCH
- V órtex GENIE 2
- Estufa P.SELECTA CONTERM
- Micropipetas 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l, EPPENDORF

- Potenciómetro HI-1048P
- Cocina eléctrica
- Balanza analítica electrónica OHAUS AR 2140
- Microscopio CARL ZEISS PRIMOSTAR
- Centrifuga HETTICH EBA-20
- Espectrofotómetro BELTEC SCIENTIFIC
- Baño María PASSED LONDON

3.2.5. Otros

- Algodón
- Asa de kohle
- Barbijo
- Cooler
- Gasa
- Gradilla
- Guantes
- Papel filtro WHATMAN N°42
- Papel aluminio
- Papel craft
- Tubos eppendorf
- Parafilm
- Tubos eppendorf 1,5 ml, 2 ml.

3.3.MÉTODOS

3.3.1. Obtención de muestra de Kéfir

La muestra de Kéfir artesanal, obtenida de un proveedor de Lima; fue transportada por vía terrestre de la ciudad de Lima a Arequipa en una caja de tecnopor, la cual contenía un envase de vidrio (50 ml) con la muestra de kéfir. Recibida la muestra fue pesada. Posteriormente la muestra fue conservada en la refrigeradora a una temperatura de -4°C para evitar la proliferación de los gránulos de kéfir.

3.3.2. Activación y producción de los gránulos de kéfir ^(78,12)

Los gránulos de kéfir originarios de Lima fueron extraídos de la refrigeradora y puestos a temperatura ambiente; la muestra de kéfir fue colocada en un colador para separar los gránulos de kéfir de la leche fermentada, posteriormente los gránulos fueron lavados con 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente para eliminar restos de partículas de la leche fermentada, se escurrió el agua. Se pesaron los gránulos de kéfir en una balanza analítica para determinar la biomasa. Los gránulos de kéfir fueron colocados en un recipiente de vidrio (250 ml) con tapa de plástico para evitar el contacto directo con el aire y se le agregó 25 ml de leche entera UHT “GLORIA, se incubó a temperatura ambiente durante 72 horas. Transcurridas las 72 horas se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada con ayuda de un colador de plástico, se lavaron con 50mL de agua destilada, se escurrieron y se les determinó la biomasa final.

La producción de los gránulos de kéfir se realizó durante cuatro semanas, siguiendo procedimiento indicado anteriormente. Transcurridas cuatro semanas se determinó el peso de los gránulos de kéfir en una balanza analítica para determinar la biomasa.

3.3.3. Caracterización Físicoquímica del Kéfir

- **Determinación de biomasa** ⁽⁷⁸⁾: Se pesó 10,0 g (biomasa inicial) de gránulos de kéfir y fueron colocados en un recipiente de vidrio (250 ml) con tapa de plástico y se le agregó 100 ml de leche entera UHT “GLORIA (relación 1:10), se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas. Transcurridas 48 horas se separaron los gránulos de kéfir de la leche fermentada con ayuda de un colador de plástico, se lavaron con 50mL de agua destilada, se escurrieron y se les determinó la biomasa final. Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje del aumento de biomasa.

Se determinaron las características sensoriales, pH y acidez titulable al kéfir producto de la fermentación.

- **Medición de pH:** Se calibró el potenciómetro HI-1048P - con buffer pH 4 y buffer pH 7, se agitó la leche fermentada por 24 horas a 22°C con una bagueta, posteriormente se sumergió electrodo.
- **Acidez Titulable** ⁽⁷⁹⁾: Para determinar el porcentaje de acidez titulable se colocó 15 ml de muestra de kéfir (leche fermentada) en un erlenmeyer de 50 mL y se agregó 15 ml de agua destilada, para diluir la muestra. Posteriormente se añadieron 3 gotas de fenolftaleína, se agitó y se valoró con solución de NaOH 0,1 N para determinar la acidez titulable como el equivalente en masa de ácido láctico, hasta obtener un color rosa persistente, se reportó la acidez como porcentaje de ácido láctico por peso utilizando la siguiente ecuación ⁽⁷⁹⁾:

$$\% \text{ Acidez Total} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N} \times 0,09}{\text{g de muestra}} \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Dónde:

N = Normalidad del hidróxido de sodio.

0,09 = Miliequivalentes del ácido láctico.

- **Humedad:** El porcentaje de humedad fue determinado por el método gravimétrico. Se calentó la estufa a 135°C, el envase de vidrio vacío fue colocado en la estufa durante una hora para eliminar el porcentaje de humedad existente en el envase. Transcurrida la hora, se trasladó el envase al desecador empleando pinzas para evitar que el recipiente absorba humedad del medio ambiente, se dejó enfriar durante 30 minutos y se colocó el recipiente en una balanza para determinar su peso. Posteriormente se pesó 2,0 g de muestra en el recipiente de vidrio, se colocó el envase que contenía 2,0 g de la muestra en la estufa a 135°C lo durante 2 horas. Empleando pinzas, se trasladaron los contenedores al desecador, se dejaron enfriar y luego se pesaron para determinar el porcentaje de humedad.

- Se calculó la pérdida de peso como humedad utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

m_1 = Peso del envase vacío, en gramos.

m_2 = Peso del envase con la muestra antes del secado, en gramos.

m_3 = Peso del envase con la muestra desecada, en gramos.

- **Sólidos Totales** ⁽⁸⁰⁾: Se determinó el porcentaje de sólidos totales a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100\% - \text{Humedad} \quad (\text{Ec.3})$$

- **Determinación de Densidad** ⁽⁸⁰⁾: La medición de esta propiedad, se realizó a través del método gravimétrico, empleando un picnómetro. Se determinó el peso del picnómetro vacío (m_1) de 50 ml en la balanza analítica, antes de determinar el peso del picnómetro, fue limpiado y secado; posteriormente se llenó el picnómetro con agua destilada hasta rebosar, se colocó el tapón, el picnómetro fue secado cuidadosamente por fuera, se procedió a determinar el peso del picnómetro con el

agua (m_2). Se descartó el agua del picnómetro; finalmente se determinó el peso del picnómetro con el kéfir (m_3).

La densidad se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \quad (\text{Ec.4})$$

- **Características sensoriales** ⁽⁸⁰⁾: Se determinó las características sensoriales de aspecto, olor, color, sabor, y textura a la muestra de kéfir producto del proceso de fermentación.

3.3.4. Aislamiento del consorcio de levaduras *Kluyveromyces spp.* obtenidas de la muestra de kéfir

Se preparó medio Saboraud cuya composición se muestra en la Tabla N°8. Se diluyó 6,5 g de medio en 100 ml de agua destilada; se llevó a la autoclave por 15 min a 121°C. Se dejó enfriar a una temperatura no menor a los 40°C para poder colocar el antibiótico Cloranfenicol (0.4g/l) sin producir desnaturalización. El medio fue distribuido en cinco placas y se dejó enfriar. Posteriormente se tomó 0,5 ml de muestra de kéfir, y se sembró en el medio Saboraud utilizando el método de estría, se incubaron a 37°C por 72 horas.

Tabla N°8. Composición del medio Sabouraud con cloranfenicol ⁽¹⁾

Peptona de Caseína	5,0 g
Peptona de Carne	5,0 g
Glucosa	40,0 g
Agar Agar	15,0 g
Cloranfenicol	0,05 g
Agua Destilada	1000 ml

⁽¹⁾ Marshall ⁽⁸¹⁾

Las cepas que crecieron en el medio Sabouraud fueron evaluadas según sus características morfológicas. Posteriormente las colonias fueron sometidas a un estudio microscópico que consistió en preparar un frotis delgado sobre un portaobjetos, donde se realizó la tinción de Gram. Las muestras fueron observadas al microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión (1).

- **Medio de cultivo selectivo** ^(82,83): Se seleccionó el medio de cultivo selectivo para *Kluyveromyces spp.* Se pesaron los reactivos del medio selectivo para *Kluyveromyces spp.* cuya composición se observa en la Tabla N° 9, se llevó a la autoclave por 15 min a 121°C. El medio fue distribuido en 8 frascos de vidrio de 15 ml (previamente autoclavados).

Tabla N°9. Composición del medio de aislamiento ⁽¹⁾

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂	0,4 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
Lactosa	20,0 g
Extracto de Levadura	10 g
Penicilina	6.2 mg
Agua	1000ml

¹Barnett *et al* ⁽⁸²⁾

La selección se realizó de la siguiente manera: se tomó las cepas seleccionadas del agar sabouraud, las cuales fueron inoculadas en el medio selectivo y homogenizadas mecánicamente, se cultivaron por 48 h a 37 ° C en un agitador rotatorio a 100 rpm. Pasadas las 48 h se tomaron seis de las muestras ya que presentaron mayor turbidez en el medio selectivo

Se realizó una dilución 1: 10 de la siguiente manera: se tomó 1 ml de cada inóculo y se le añadió a un tubo con 9 ml del medio selectivo. Se prepararon placas de medio YM cuya

composición se muestra en la Tabla N° 10, se sembró utilizando el método por estrías y se incubó a 37°C por 72 horas; las cepas aisladas fueron caracterizadas posteriormente. Seis de los aislados fueron elegidos para caracterización adicional después de este procedimiento.

Tabla N°10. Composición del medio YM ⁽¹⁾

Lactosa	20,0 g
Peptona	10,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1000ml

⁽¹⁾Varga-Erdei ⁽⁸³⁾

3.3.5. Caracterización Bioquímica y Morfológica de las colonias: Se identificaron las colonias crecidas en el medio de cultivo de acuerdo al color, forma y tamaño de las mismas. Luego se procedió a hacer una coloración gram para identificarlas al microscopio.

Para asegurar la presencia de *Kluyveromyces spp.* Se procedió a realizar las siguientes pruebas: Tinción Gram, TSI, determinación de producción de etanol, citrato, fermentación de azúcares.

- a) **Tinción GRAM ⁽⁸⁴⁾:** Se realizó un frotis de las seis cepas y se fijaron al calor, luego se añadió el reactivo cristal violeta y se esperó 1 minuto. Todas las células gram positivas y gram negativas se tiñen de color azul-púrpura. Se enjuagó con agua y se agregó lugol, se esperó 1 minuto, nuevamente se enjuagó con agua y se agregó alcohol- acetona, se esperó de 8 a 15 segundos aproximadamente, se enjuagó con agua y se agregó el reactivo safranina por 45 segundos. Este tinte dejará de color rosado-rojizo a las células Gram negativas. Se enjuagó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se observó al microscopio a 100x con aceite de inmersión.

- b) **TSI** ⁽⁸⁴⁾: Se inocularon las seis cepas, la siembra se realizó tanto en superficie (aerobiosis) como en la profundidad del agar (anaerobiosis). Se inocularon las seis cepas en tubos con medio TSI inclinado, para eso se introdujo el asa de siembra hasta 3 a 5 mm. del fondo del tubo. Luego de retirar el alambre del fondo, se deslizó el asa suavemente por su superficie en zig-zag, se realizó tanto en superficie (aerobiosis) como en la profundidad del agar (anaerobiosis). Se incubó a 37°C durante 48 horas.
- c) **Citrato** ⁽⁸⁴⁾: Se inocularon las cepas aisladas en tubos con medio citrato inclinado, para eso se introdujo la punta hasta 3 a 5 mm. del fondo del tubo. Luego de retirar el alambre del fondo, se deslizó el asa suavemente por su superficie en zig-zag. Se incubaron a 37°C durante 48 horas.
- d) **Fermentación de Azúcares** ⁽⁸⁵⁾: Se determinó la fermentación de lactosa, glucosa, galactosa y maltosa de las seis cepas. Se preparó el medio basal de fermentación para lo cual se pesó 4,5 g de extracto de levadura, 7.5 g peptona, 20,0 g de azúcar (los azúcares utilizados fueron lactosa, glucosa, galactosa y maltosa); los reactivos fueron diluidos en 1 litro de agua destilada; posteriormente se adicionó 4 ml de solución de azul de bromotimol (50mg/75ml en agua destilada) por cada 100ml del medio basal de fermentación. El pH del medio fue ajustado a 7 con NaOH 0,1 N. El medio se dispensó en tubos de Durham (4 ml en cada tubo) y se esterilizó al 121 ° C durante 10 min. Los tubos fueron inoculados con un cultivo al 10% v/v en fase exponencial y se incubó al 37 ° C durante 7 días.

Este procedimiento se realizó para cada uno de los azúcares utilizados.

Los resultados positivos fueron indicados por la acumulación de gas en los tubos de Durham y el cambio de color en el indicador del verde oscuro al amarillo.

- e) **Determinación de la cualitativa de bioetanol 1.5G** ⁽⁸⁶⁾: Se determinó cualitativamente la producción de bioetanol 1.5G por las levaduras aisladas mediante el método de yodoforno. Se agregó 5ml del medio de cultivo con crecimiento de levaduras durante 48 horas, 2 ml de hidróxido de sodio 10% y 3 ml de lugol lentamente, la mezcla se dejó reposar por 5 minutos. Se determinó la presencia de

etanol por la formación de un precipitado amarillo correspondiente a la formación de yodoformo. Para establecer diferencias en la formación del precipitado se prepararon controles de etanol.

3.3.6. Recolección de muestras de lactosuero proveniente de empresas lácteas de la provincia de Arequipa

- **Recolección de muestra:** La muestra de lactosuero, producto del proceso de fabricación de queso Parmesano; fue recolectada en 2 recipientes de plástico con capacidad de 7 litros cada uno, dichas muestras fueron proporcionadas por la empresa LAIVE S.A. después de obtener la muestra, los recipientes fueron sellados con parafilm y cerrados herméticamente con las tapas para evitar contaminación. Luego de realizar la recolección de la muestra, fue distribuida en 6 envases de plástico con capacidad de 2,5 litros cada uno para su conservación a -4°C hasta su posterior uso.

3.3.7. Determinación de las características Físicoquímicas del lactosuero.

a) Determinación de Lactosa ⁽⁸⁷⁾

La lactosa fue determinada mediante el Método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico ⁽⁸⁷⁾.

Preparación de la Curva de Calibración

Para la preparación de la curva de calibración se prepararon las siguientes soluciones:

- a) Solución stock de lactosa 0.1mg/ml: se pesó 25 mg. de lactosa y se disolvió con 15 ml de agua destilada, se traspasó la solución a una fiola de 25 ml y se enrasó con agua destilada.
- b) Fenol al 5%: se pesó 5 g de fenol, se disolvió en un vaso de precipitado con 25 ml de agua y se traspasó a una fiola de 100ml y se enrasó con agua destilada. Se almacenó en un frasco ámbar para evitar la degradación de los componentes.

- Curva de Calibración:

Se prepararon soluciones a partir de la solución stock de lactosa 0,1mg/ml en un rango de 0,02 a 0,1 mg/ml. Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar los volúmenes de los patrones de concentración (Tabla N°11). Para realizar la curva de calibración se utilizó 250 μ l, de Fenol 5%, ácido sulfúrico concentrado y volúmenes de 100, 200, 300, 400, 500 μ l, de solución stock de lactosa 0,1mg/ml. Los tubos que contenían los patrones fueron agitados tubo por tubo para capturar algunos restos de ácido por las paredes del tubo, se dejó reposar por 10 minutos y se puso en baño maría a 30°C por 30 minutos ya que el complejo alcanza su máximo desarrollo a los 30 min. Las mediciones de las absorbancias de cada patrón de concentración se realizaron a 492 nm. Se utilizó como blanco agua destilada (patrón de 0 mg/ml). Posteriormente se construyó la curva de calibración utilizando los datos de la absorbancia leída contra los mg/ml de lactosa.

Tabla N°11. Elaboración de la curva de calibración para determinación de lactosa.

N°Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Solución stock de lactosa 0.1mg/ml (μ l,)	0	100	200	300	400	450	500
H ₂ O destilada (μ l,)	500	400	300	200	100	50	0
Concentración Final (mg/ml)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,09	0,1
Fenol 5% (μ l,)	250	250	250	250	250	250	250
Ac. Sulfúrico (μ l,)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tratamiento de la muestra:

Para determinar la concentración de lactosa se realizó una dilución de 1: 500 para cada una de las muestras obtenidas, se tomó 500 μ l, de la dilución, se adicionó 250 μ l, de fenol al 5%

y rápidamente se añadió 1000 μ l, de ácido sulfúrico concentrado tratando de no deslizarlo por las paredes del tubo. Posteriormente se agitó el tubo para capturar algunos restos de ácido sulfúrico en las paredes del tubo, se dejó incubar por 10 minutos y se puso en baño maría a 30°C por 30 minutos. La medición de la absorbancia se realizó a 492 nm.

3.3.8. Tratamiento del suero de leche ⁽⁸⁸⁾

Se realizó un tratamiento termoácido para separar las proteínas coagulables del suero de leche. Se midió 1 L de lactosuero y se ajustó el pH con HCl 1N hasta llegar a 4,5, posteriormente el lactosuero fue sometido a un tratamiento térmico a 115 °C por 20 minutos en autoclave para su concentración. Se dejó enfriar hasta una temperatura por debajo de 35°C para la precipitación de proteínas. Finalmente las proteínas fueron separadas por decantación y filtrado al vacío con papel Whatman N°42.

3.3.9. Elaboración del Medio de Fermentación ⁽⁸⁹⁾

El medio de cultivo, con la concentración deseada de lactosa, fue suplementado con extracto de levadura, sulfato de amonio y sulfato de magnesio. Se preparó 1,5 L del medio de fermentación cuya composición se muestra en la Tabla N°12. Se pesaron los reactivos y se esterilizó en un a 121 °C durante 15 minutos, para su posterior almacenamiento a -4°C.

Tabla N°12. Composición del medio de Fermentación ⁽¹⁾

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de levadura	0,75
Sulfato de Amonio	0,84
Sulfato de Magnesio	0,05
Lactosuero	100 ml

¹Araujo et al. ⁽⁸⁹⁾

3.3.10. Cinética de crecimiento, consumo de Lactosa y producción de Bioetanol

a) *Preparación del Inóculo:*

Cada una de las seis cepas fue inoculada, se tomó 1 ml del medio líquido que contenía las cepas de *Kluyveromyces* spp. (Se inoculó 1,5 ml de medio líquido con colonias aisladas hasta que se obtuvo una suspensión equivalente a la escala 4 de Mac Farland). Este inóculo se incubó por 24 horas a 37° C con agitación constante (60 rpm). El volumen del inóculo 25ml correspondió al 10% del volumen total de trabajo. Se estableció 12×10^8 u.f.c/ml

b) **Determinación de la cinética de crecimiento** ⁽⁸⁹⁾:

Para determinar la cinética de crecimiento se inoculó *Kluyveromyces* spp. 10% (v/v) en 250 ml de medio de fermentación cuya composición se muestra en la Tabla N°11. Se dejó crecer por 13 horas a 37° C con agitación constante (100 rpm).

Para determinar la curva de crecimiento de cada una de las cepas, se tomó muestras para realizar la medición espectrofotométrica. Se tomó muestras de 4,5 ml de medio de fermentación en 3 tubos eppendorf, cada hora durante 13 horas. Luego de ser tomadas las muestras, fueron colocadas en el refrigerador para detener su crecimiento. Con las muestras obtenidas se realizaron los análisis de determinación de biomasa, consumo de lactosa y producción de bioetanol 1.5 G posteriormente.

c) **Métodos de Análisis**

- **Biomasa** ⁽⁹⁰⁾: La concentración de biomasa se determinó turbidimétricamente, midiendo la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm. Para lo cual se tomó 2ml del medio de fermentación se enrasó y se midió en el espectrofotómetro con una celda de cuarzo de 1cm a 540nm utilizando como blanco el medio de fermentación sin inóculo. Este procedimiento se realizó con cada una de las muestras obtenidas.
- **Determinación de Lactosa** ⁽⁸⁷⁾: La lactosa fue determinada mediante el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico cuyo procedimiento se encuentra en la página

43, para lo cual se utilizó 0,5 ml del medio de fermentación y se siguió el procedimiento mencionado anteriormente. Este procedimiento fue realizado con cada una de las muestras producto del proceso de fermentación.

- **Determinación de Bioetanol 1.5G:**

El bioetanol 1.5G fue determinado mediante el método del Dicromato de Potasio ⁽⁸⁶⁾

Preparación de Reactivos:

Para la preparación de la curva de calibración se prepararon las siguientes soluciones:

- ✓ Solución Oxidante: Se mezcló 4,165 g de dicromato de potasio y 250 ml de ácido sulfúrico concentrado en un vaso de precipitado de 600 ml. Luego esta solución se pasó a una fiola de 1000ml y se completó hasta el aforo con agua destilada.
- ✓ Solución de carbonato de potasio: Se mezcló 20 g de carbonato de potasio en un vaso de precipitado de 250 ml hasta su disolución. Luego esta solución fue transferida a una fiola de 100ml y se completó con agua destilada hasta el aforo.

Después de tener las dos soluciones preparadas se realizó la solución final:

- ✓ Solución final: Se tomaron 4 ml de la solución oxidante en un tubo de ensayo y luego se adicionó gota a gota, 2 ml de solución de carbonato de potasio.
- ✓ Preparación de la Curva de Calibración: Se prepararon diferentes concentraciones de etanol en agua destilada como se muestra en la Tabla N°13.

Tabla N°13. Reactivos empleados en la curva de calibración para la determinación de Bioetanol 1.5 G.

NºDilución	Blanco	1	2	3	4	5
Etanol (µl,)	0	400	800	1000	1200	1400
H ₂ O destilada (µl,)	2000	1600	1200	1000	800	600
Concentración Final g/L	0	20	40	50	60	70
Solución final (µl,)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

Se determinó el bioetanol 1.5G mediante la técnica del dicromato, se tomó 2 ml de medio de fermentación (se centrifugó a 3200 rpm durante 30 min) y fue mezclado con 2ml de solución oxidante de dicromato de potasio. La mezcla se homogenizó en vortex a 1500 rpm y se calentó en baño maría a 85°C por 30 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 440nm, posteriormente se interpoló en la curva de calibración. Los resultados de etanol fueron reportados en g/L. Se reportó el valor de etanol en g/L. mediante la prueba de dicromato de potasio se eligieron las dos mejores levaduras productoras de bioetanol.

3.3.11. Balance Estequiométrico para la producción de Bioetanol 1.5 G

Se planteó la ecuación elemental para el proceso de producción de Bioetanol 1.5 G, los datos utilizados fueron obtenidos de la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces spp.* Para plantear la ecuación elemental se utilizó la composición promedio de los reactivos y productos. El modelo estequiométrico tomó forma de un sistema de ecuaciones lineales obtenidas al realizar los balances elementales, con los cuales se aplicó balances a la ecuación elemental.

La estructura general de la ecuación de producción de bioetanol 1.5 G siguió la siguiente secuencia:



Donde:

- ✓ $C_X H_Y O_W$: Fuente de carbono.
- ✓ $N_d H_a O_b$: Sustrato Nitrogenado
- ✓ O_2 : Oxígeno
- ✓ $C H_\alpha O_\beta N_\delta$: Biomasa
- ✓ $C H_r O_s N_t$: Etanol
- ✓ Generando también H_2O y CO_2 .

Para la solución del modelo estequiométrico planteado en este trabajo, se utilizó una hoja de Microsoft Excel con macros en visual basic, dichos balances fueron resueltos formando una matriz elemental. La hoja de cálculo utilizada fue estequiometria microbiana.xlsx. en Microsoft Excel 2007⁽⁹¹⁾.

3.3.12. Diseño del sistema de fermentación Batch: Comparación entre dos sistemas de fermentación: con soporte y sin soporte en un reactor Batch.

Se utilizó un reactor Batch de acero inoxidable con una capacidad de 3,5 L cerrado y enchaquetado. La agitación se realizó por medio de paletas de acero inoxidable, las cuales iban conectadas a un motor a 100 rpm, se utilizó las paletas como sistema de agitación, este se realizó para aumentar el área de contacto entre las levaduras y el sustrato, además de garantizar que las muestras tomadas fueran homogéneas, para los posteriores análisis. El biorreactor permaneció durante todo el proceso de fermentación a una temperatura de 37°C. Se realizó comparaciones de producción entre un reactor con soporte (pepas de aceituna) y un reactor sin soporte.

- a) **Sistema de fermentación sin soporte:** Inicialmente se preparó el inóculo, para la preparación del inóculo se utilizaron las dos cepas con mayor producción de etanol para la formación del consorcio. Las dos cepas seleccionadas fueron inoculadas, se tomó 1 ml del medio líquido que contenían las cepas de *Kluyveromyces spp.* (Se inoculó 1,5 ml de medio líquido con colonias aisladas hasta que se obtuvo una suspensión equivalente a la escala 4 de Mac Farland). Este inóculo se incubó por 48 horas a 37° C con agitación constante (60 rpm). El volumen del inóculo fue de 150 ml que correspondió al 10% del volumen total de trabajo. Se estableció 12×10^8 u.f.c/ml La fermentación se llevó a cabo en un reactor Batch, cilíndrico de acero inoxidable de una capacidad de 3,5 litros, cerrado y enchaquetado (Figura N°6-A) que se agitó a 100 rpm, al cual se le agregó 1,5 L del medio de fermentación cuya composición se encuentra en la tabla N°12, posteriormente se inoculó *Kluyveromyces spp.* 10% (v/v) en fase exponencial; transcurridas 8 horas se agregó 1,5 L del aceite

de Soya refinado “FRIOL”, se dejó a una temperatura de 37°C, se sacó muestras cada hora durante 12 horas.

b) Sistema de fermentación con soporte

- ✓ **Preparación del soporte** ⁽⁹²⁾: Se seleccionó pepas de aceitunas (1-2cm), las cuales se sumergieron durante una hora en una solución de detergente a una temperatura de 80 ° C, luego fueron enjuagados tres veces durante 10 minutos con agua destilada para eliminar la contaminación presente en la superficie. Las pepas de aceituna se calentaron a 80°C, posteriormente se autoclavaron a una temperatura de 121 ° C durante 15 minutos antes de la fermentación.
- ✓ **Preparación del semillero**: Se esterilizó 300 ml solución de lactosuero suplementado (Tabla N°12), la solución se colocó en un envase de vidrio de 500ml que contenía el soporte natural. Se inoculó *Kluyveromyces spp.* 10% (v / v) en fase exponencial en la solución de lactosuero. Se incubó durante 14 días a 30 ° C y 100 rpm. La fermentación se llevó a cabo en un reactor Batch, cilíndrico de acero inoxidable de una capacidad de 3.5 litros, cerrado y enchaquetado (Figura N°6-B), que se agitó a 100 rpm. Inicialmente el soporte con las *Kluyveromyces* adheridas fueron colocados en el reactor, se agregó 1,5 L del medio de fermentación (Tabla N°12), transcurridas 8 horas se agregó 1,5 L de aceite de soya refinado “FRIOL”, se dejó por 12 h a una temperatura de 37°C, se fueron sacando muestras cada hora.

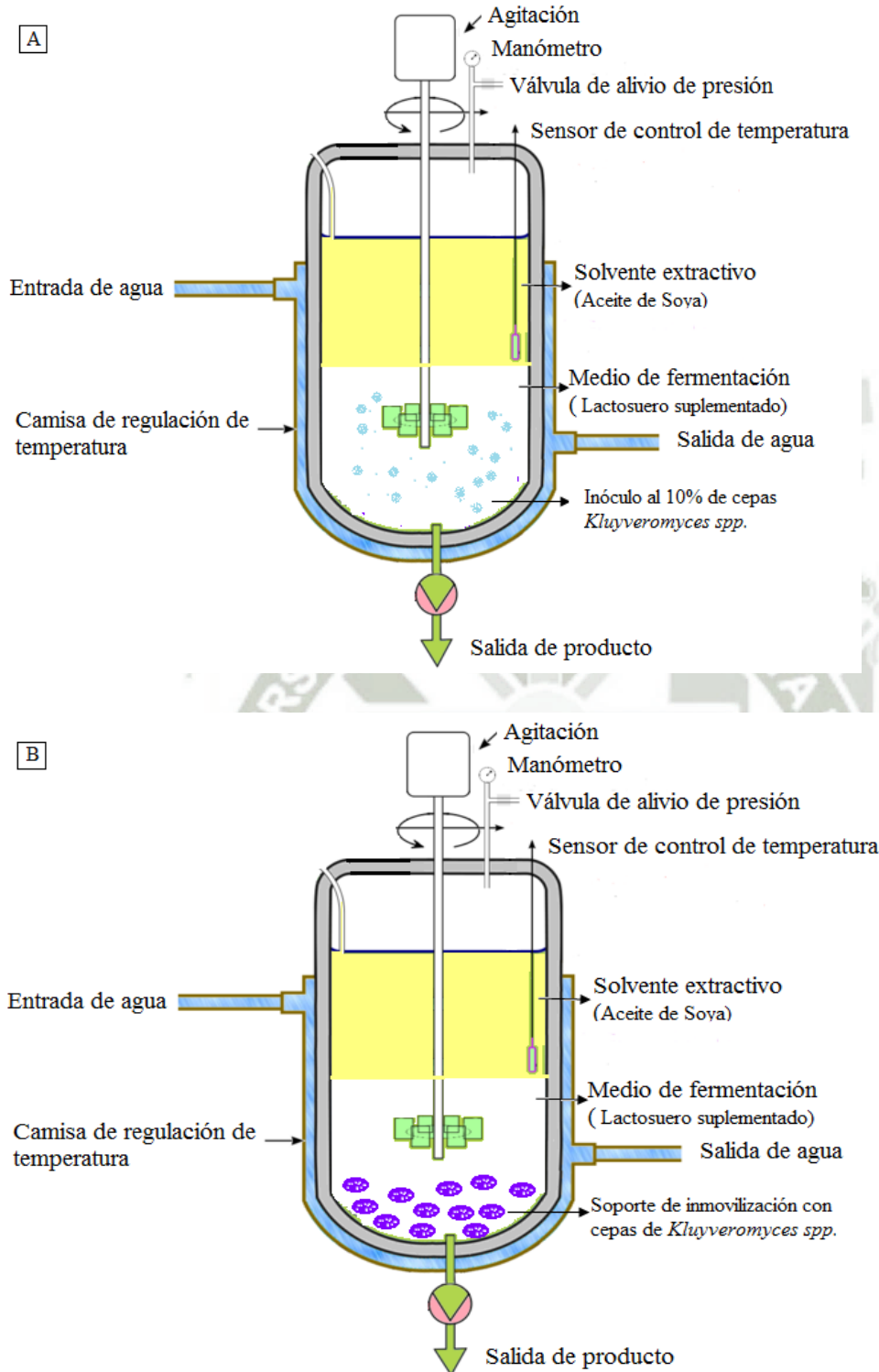


Figura N°6. Diseño del sistema de fermentación para la producción de bioetanol 1.5 G.
A) Diseño del sistema de fermentación sin soporte. B) Diseño del sistema de fermentación con soporte.

Métodos de Análisis

a) Determinación de Bioetanol 1.5G:

- **Determinación de Bioetanol 1.5 G en la fase acuosa:** Después de 8 horas de fermentación se comenzaron a sacar muestras (10 ml) cada hora durante 12 horas del medio de fermentación en el sistema de fermentación sin soporte, el mismo procedimiento se realizó con el sistema de fermentación con soporte; dichas muestras fueron analizadas por el método del dicromato de potasio cuyo procedimiento se muestra en la página 47.
- **Determinación de Bioetanol 1.5 G en el Solvente de Extracción:** Después de 20 horas de fermentación se tomó una muestra del aceite de soya refinado “FRIOL” del sistema de fermentación con soporte y una muestra del aceite de soya refinado del sistema de fermentación sin soporte. Cada muestra fue almacenada en frascos de 15 ml. Las muestras fueron almacenadas en la refrigeradora a una temperatura de -4°C . Posteriormente fueron enviadas al Laboratorio de Electroquímica e Nanotecnología (LEN) del Instituto de Tecnología e Pesquisa (ITP), situado en el campus Aracaju-Farolândia de la Universidad de Tiradentes (UNIT) –Brasil.
El equipo utilizado para la detección electroquímica de etanol fue un potenciostato/galvanostato modelo (Autolab PGSTAT 302N) acoplado a un computador. Para los estudios electroquímicos fue utilizada una celda electroquímica de un compartimento con volumen de 40 mL, confeccionada en vidrioPirex[®], con tapa de Teflón con orificios para los electrodos de trabajo, referencia y contra electrodo, así como, para la entrada y salida de gases. El electrodo de trabajo consistía en un disco de platina con área de $19,63\text{ mm}^2$, un electrodo auxiliar (contra electrodo) de placa de platina con área de 200 mm^2 y un electrodo de referencia de hidrogeno preparado en la misma solución (EHMS), que se encontraba inmerso en un capilar de Luggin.

Para la producción de hidrogeno en el electrodo de referencia, fue utilizada una solución de hidróxido de sodio (NaOH) $0,1\text{ mol L}^{-1}$, que es la concentración básica

de trabajo utilizada en todos los experimentos, aplicándose un potencial negativo constante de aproximadamente 4,0 V, usando una fuente estabilizadora por un tiempo aproximado de 20 segundos. Todos los potenciales presentados aquí se encuentran referidos a este electrodo de referencia.

Un esquema del sistema usado abarcando el potenciostato, la celda y el sistema de adquisición de datos se encuentra en la Figura N°7.

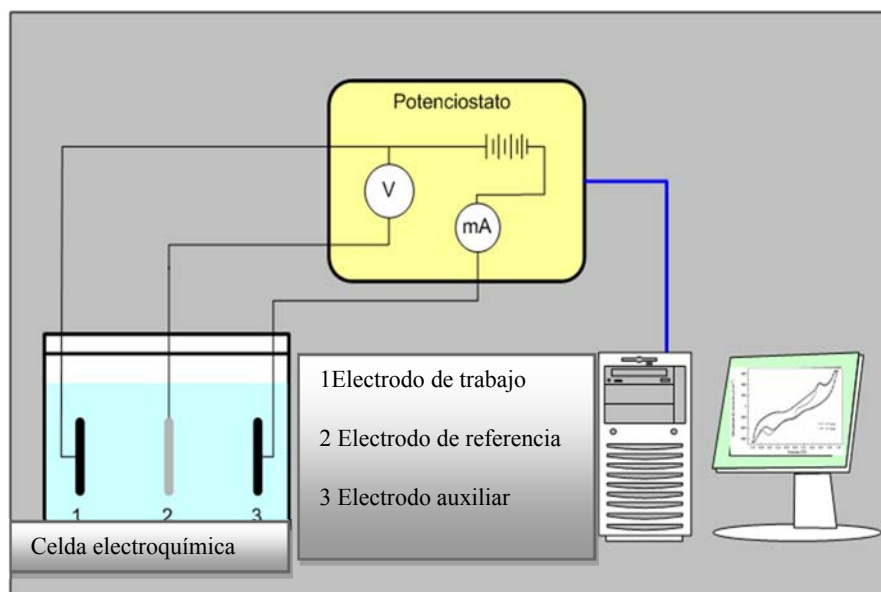


Figura N°7. Diagrama en bloques de la celda electroquímica, del potenciostato y del sistema de adquisición de datos.

- ✓ Limpieza y activación del electrodo de trabajo:

Fue preparada una solución electrolítica de hidróxido de sodio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para ejecutar la limpieza y activación de los sitios activos del electrodo de disco de platina.

Para la activación del electrodo de disco de platina fue realizada una secuencia de voltametrías cíclicas con diferentes velocidades de barrido entre los potenciales correspondientes a las reacciones de descomposición del agua (entre $-0,1 \text{ V}$ y $1,4 \text{ V}$). Inicialmente fueron realizados ciclos voltamétricos a 500 mV s^{-1} (500 ciclos), luego a 200 mV s^{-1} (50 ciclos) y finalmente a 100 mV s^{-1} (20 ciclos) y se guardó el último ciclo para hacer una comparación antes de cada detección.

- Detección electroquímica del Bioetanol 1.5 G:

Para la detección del bioetanol 1.5 G fueron inicialmente preparadas diferentes soluciones de NaOH (Sigma-Aldrich, P.A. 98%) con concentración de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ las que contenían diferentes concentraciones de etanol (Sigma-Aldrich, 99,5%), desde $0,2 \text{ g L}^{-1}$ hasta 30 g L^{-1} . Con estas soluciones fue construida una curva analítica donde se determinó la corriente de pico obtenida para cada concentración de etanol, la misma corresponde a la corriente de pico de oxidación de etanol, permitiendo de esta forma su futura detección y cuantificación en la muestras de la fermentación, obtenidas en este trabajo.

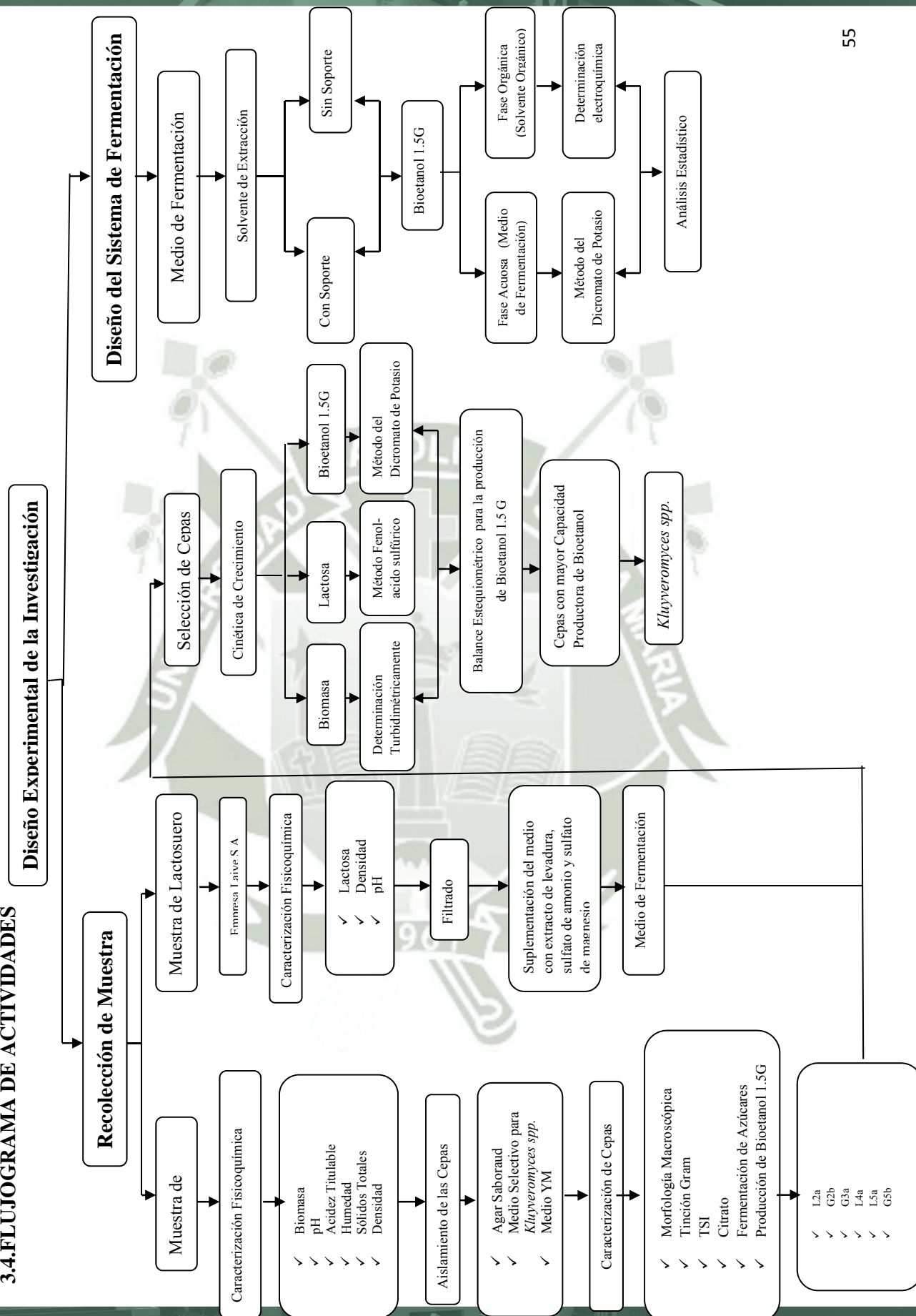
La técnica electroquímica usada para la determinación de etanol y construcción de la curva analítica fue la voltametría lineal, barriendo desde un potencial de $0,1 \text{ V}$ hasta $1,4 \text{ V}$ (*versus* EHMS) a 100 mV s^{-1} . En esta técnica se hace un barrido de potenciales usando una velocidad de barrido previamente determinada y monitorea la corriente obtenida de algún proceso electroquímico. Esta corriente es directamente proporcional a la concentración del compuesto electro activo.

Para la determinación de la concentración de bioetanol 1.5 G en las muestras del fermentado (Etanol en solvente de extracción 1, Etanol en solvente de extracción 2) fueron colectadas alícuotas de 2 mL del fermentado y disueltas en 33 mL de solución de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Después de homogenizadas usando una corriente de nitrógeno puro, se realizaron las experiencias electroquímicas para la detección de etanol por voltametría lineal.

3.3.13. Análisis Estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), completamente aleatorio, para evaluar los resultados obtenidos en la producción de bioetanol 1.5 G, consumo de lactosa y biomasa; así como también los datos en la determinación del efecto del soporte de inmovilización en la producción de bioetanol 1.5 G. Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional Statgraphics Centurion X4. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

3.4.FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de muestra de Kéfir.

La obtención de muestra de kéfir se realizó en el mes de abril del 2013. Obtenida de un proveedor de la ciudad de Lima, fue transportada por vía terrestre de la ciudad de Lima a Arequipa. Recibida la muestra fue pesada en la balanza analítica, obteniendo un peso de 4,3982 g de gránulos de kéfir y 12,8 ml de leche fermentada, la mayoría de los gránulos estaban apelmazados. La muestra fue conservada en la refrigeradora a una temperatura de 4°C para evitar la proliferación de los gránulos de kéfir.

4.2. Activación y producción de los gránulos de Kéfir

Los gránulos de kéfir fueron activados y cultivados en leche “GLORIA UHT” se realizaron 10 subcultivos a 20°C durante 30 días, este procedimiento fue realizado para aumentar la cantidad de gránulos de kéfir. Transcurrido el tiempo indicado, se determinó la cantidad de biomasa.

La biomasa inicial de gránulos de kéfir fue de 4,3982g y en el lapso de 30 días se incrementó hasta obtener un peso de 19,8580 g, es decir hubo un incremento de 15,4598 g de gránulos de kéfir. Al cultivar los gránulos de kéfir en leche “GLORIA UHT” incrementan su peso debido al crecimiento de los microorganismos y el aumento de la matriz de polisacárido y proteína que rodean los gránulos de kéfir. Asimismo no se observaron diferencias en la apariencia de los gránulos luego de 10 subcultivos sucesivos. Los resultados obtenidos fueron alentadores ya que el aspecto de los gránulos nos da información acerca de su estado fisiológico y el aumento de peso indica que la microbiota presente en los gránulos está activa y el balance de microorganismos es adecuado siendo esto necesario para la síntesis de los componentes de la matriz que los inmovilizan ⁽¹⁸⁾.

4.3. Caracterización Físicoquímica del Kéfir

En el estudio realizado también se determinó el crecimiento de los gránulos de kéfir como aumento de peso de los gránulos por etapa de fermentación, se tomaron 10,00g de gránulos de kéfir, se agregó 50 ml de leche “GLORIA UHT” y se dejó fermentar durante 48 h; transcurrido el tiempo se procedió a pesar los gránulos de kéfir obteniendo 11,604g. Los cálculos para determinar el porcentaje de aumento de la biomasa fueron realizados, obteniendo un incremento de 1,6%. Posteriormente se determinó el aspecto, pH, concentración de lactosa de la leche producto de la fermentación, de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 3.

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla N° 14. y los cálculos en extenso se muestran en el Anexo 1.

Tabla 14. Composición Físicoquímica del Kéfir.

Característica	Resultado
Ph	4,37
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% w/w)	0,774%
Humedad (%w/w)	88,65%
Sólidos Totales (%w/w)	11,35%
Densidad (g/ml)	1,0437g/ml

En la Tabla N° 14. se observa que los valores de pH obtenido al final de la fermentación (durante 48 horas) fue 4,37, el cual está dentro del rango establecido que es de 4,2 a 4,5 , pH establecido como característico por bibliografía para las leches fermentadas con gránulos de kéfir ⁽¹⁴⁾.

Se obtuvo 0,774% de acidez expresada como ácido láctico, por tanto están conforme con las especificaciones establecidas por la norma del CODEX para leches fermentadas, que especifica 0,60% mínimo de acidez titulable como ácido láctico, el porcentaje de humedad debe ser de 87,5% y se obtuvo un valor de 88,65% , esta diferencia, pudo haberse debido a

que antes de preparar la leche con los gránulos, a éstos, les quedara agua, por lavarse antes y después de cada fermentación y que al escurrirlos no la perdieron toda permaneciendo en la superficie, lo cual otorga cierta cantidad de agua al producto. El porcentaje de humedad es útil porque influye en la textura, sabor y apariencia del producto final. Se obtuvo 11,35% de sólidos totales y una densidad de 1,0437 los cuales están dentro del rango establecido como característico para las leches fermentadas con gránulos de kéfir. En Perú no hay una norma específica para leches fermentadas, por lo cual se compararon los resultados obtenidos con la Norma del *CODEX* para Leches Fermentadas *CODEX STAN 243-2003* ⁽⁹³⁾.

4.3.1. Características sensoriales del Kéfir

Se les determinó las características sensoriales a la leche fermentada obtenida a 22°C durante 48 horas. En la siguiente tabla (Tabla N° 15) se presentan las características sensoriales y los resultados obtenidos al final del proceso de fermentación.

Tabla N° 15. Análisis sensorial de la leche fermentada obtenida al final de la fermentación ⁽²⁷⁾.

Característica Organoléptica	Especificación
Color	Blanco.
Sabor	Ligeramente ácido, picante.
Olor	Característico de un producto fermentado.
Textura	Consistencia viscosa.

Los resultados obtenidos del análisis sensorial están conformes a lo que se establece en la Especificación Técnica Cubana NC-TS 457:2007 para leches fermentadas ⁽⁹⁴⁾.

4.4. Aislamiento del consorcio de levaduras *Kluyveromyces spp.* obtenidas de la muestra de kéfir

4.4.1. Fase de selección.

Se realizó el cultivo inicial de la muestra de kéfir en agar sabouraud con cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias, a una temperatura de 37°C por 72 horas, se obtuvieron 8 colonias de gran diversidad, de diferentes tamaños y formas. Cuya codificación se muestra en la Figura N° 8. Cada cepa fue nombrada con las letras L y G correspondientes a cepas lisas o cepas granuladas respectivamente, la letra a para las cepas pequeñas, la letra b para cepas grandes y los números del 1 al 5 correspondiente a la placa en que crecieron y fueron evaluadas según sus características morfológicas.

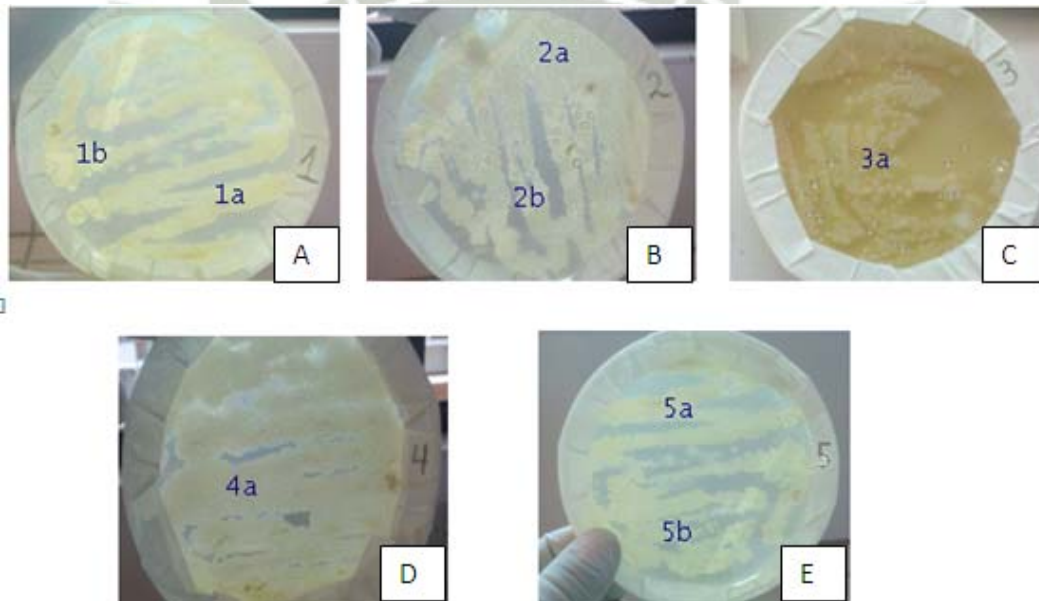


FIGURA N°8. Crecimiento en el medio de cultivo Agar Sabouraud (A) Cepa L1a; Cepa G1b, (B) Cepa L2a; Cepa L2b, (C) Cepa G3a, (D) Cepa L4a, (E) Cepa L5a; Cepa G5b.

En la Figura N°8-A se puede apreciar una placa con dos tipos de colonias, la primera 1a cuyas colonias son de aproximadamente 3mm de diámetro con una superficie lisa y 1b con colonias de 5mm de diámetro con apariencia granulada en su superficie, ambas de color crema- blanquecino y consistencia cremosa, se observó que la mayoría de las colonias se encontraban apelmazadas; en la figura N°8-B se observó colonias de diferentes tamaños: 2a de colonias con una medida aproximada de 2mm y 2b con colonias de 4 mm ambas con

superficies lisas, de color blanquecino y consistencia cremosa; en la figura N°8-C se obtuvo una placa con un tipo de colonia, con una medida de 2-3 mm de diámetro, de color crema, con apariencia granulosa en su superficie y consistencia cremosa; en la figura N°8-D se aprecia una placa con un tipo de colonia, con colonias de una medida aproximada de 2-3 mm de diámetro, color crema-blanquecino y consistencia cremosa, todas las colonias se encontraban apelmazadas; en la figura N°8-E se obtuvo dos colonias, la primera (5a) con una medida de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, de superficie lisa y la segunda (5b) con una medida aproximada de 3-5 mm, con una superficie de apariencia granulosa, ambas de color blanco y consistencia cremosa.

A partir de las colonias obtenidas en el medio saboraud con cloranfenicol se realizó la coloración Gram respectiva para cada una de las cepas y se observó en el microscopio óptico a 10X, 40X y 100X. Los resultados se presentan en la Figura N°9 y Tabla N° 16.

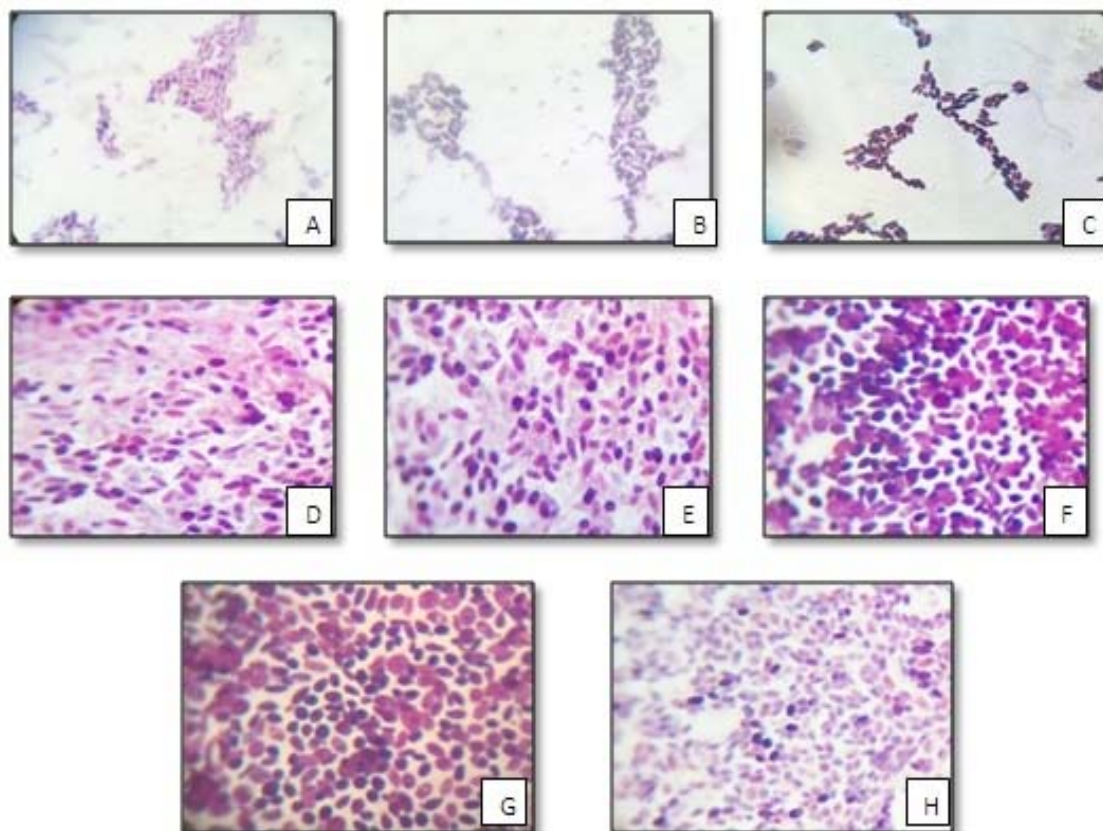


FIGURA N°9. Coloración de GRAM de las cepas obtenidas. (A) Cepa L1a, (B) Cepa G1b, (C) Cepa L2a, (D) Cepa L2b, (E) Cepa G3a, (F) Cepa L4a, (G) Cepa L5a, (H) Cepa G5b.

Tabla N°16. Caracterización microscópica mediante Tinción GRAM de las cepas aisladas.

CEPA	FORMA CELULAR	GRAM
L1a	Ovoide	Negativas
G1b	Ovoide	Positivas
L2a	Ovoide	Positivas
L2b	Ovoide	Positivas y negativas
G3a	Ovoide	Positivas
L4a	Ovoide	Positivas
L5a	Ovoide	Positivas y negativas
G5b	Ovoide	Positivas

Se realizó la tinción de Gram como primer paso de identificación para cada una de las cepas aisladas, en la cual se apreció que el 100% de las células observadas tenían forma ovoide, el 70% de las células eran gram positivas y el 30 % gram negativas. La identificación particular para cada cepa se puede observar en la tabla N°16.

- **Prueba TSI (Triple Sugar Iron ó Triple Azúcar Hierro)**

Todas las cepas aisladas fueron sometidas a esta prueba y los resultados fueron:

Tabla N° 17.Resultados obtenidos para TSI.

L1a	G1b	L2a	L2b	G3a	L4a	L5a	G5b
K/A	K/K	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Solo fermenta glucosa	No fermenta azúcares	Fermen ta tanto glucosa	Fermenta tanto glucosa	Fermenta tanto glucosa	Fermenta tanto glucosa	Fermenta tanto glucosa	Fermenta tanto glucosa
	Formación de H ₂ S	como lactosa	como lactosa	como lactosa	como lactosa	como lactosa	como lactosa

En la Figura N° 10 se puede observar los tubos con resultados obtenidos en la prueba de TSI realizadas a las ocho cepas aisladas; para las cepas L2a, L2b, L4a, L5a, G3a, G5b se obtuvo un color amarillo uniforme en todo el tubo lo cual nos indicó que el microorganismo presente en cada tubo fue capaz de fermentar glucosa y lactosa por lo cual acidifica el medio, virando de color naranja a amarillo; para las cepas L1a y G1b se observó un color rojo en el pico y amarillo en el fondo lo que nos indicó que el microorganismo presente en cada tubo sólo fue capaz de fermentar glucosa pero no lactosa, adicionalmente para la cepa G1b hubo producción de ácido sulfúrico. Se puede observar el resumen de los resultados en la Tabla N°17.

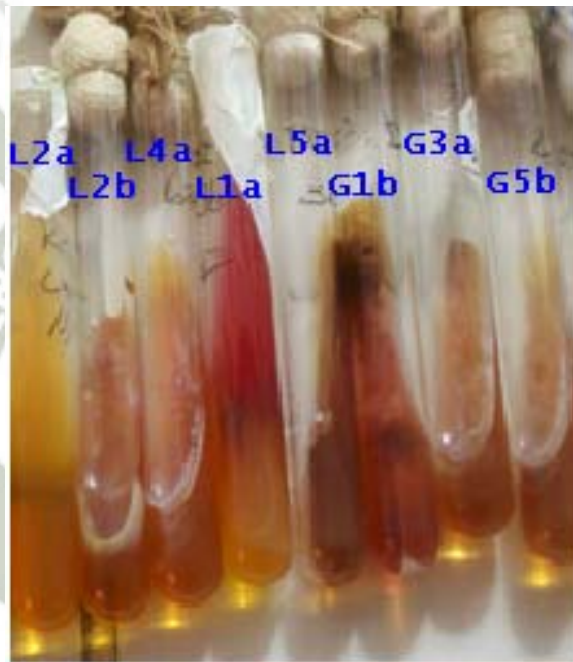


Figura N°10. Resultados de la prueba del TSI para las cepas aisladas.

4.4.2. Medio de cultivo selectivo para *Kluyveromyces spp.*

Se realizó un cultivo de cada muestra en medio líquido para *Kluyveromyces spp* a una temperatura de 37°C por 48 horas con agitación de 100 rpm (Figura N° 11.).

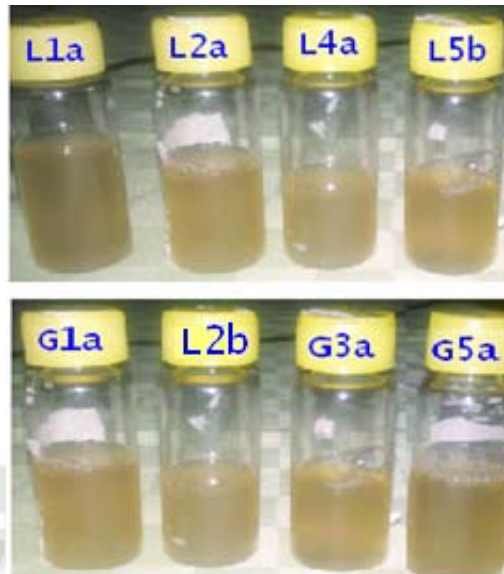


FIGURA N°11. Medio de cultivo líquido selectivo para *Kluyveromyces spp.* con crecimiento.

El medio de cultivo selectivo tiene como fuente de carbono lactosa, es un medio selectivo debido a que la especie *Kluyveromyces spp.* es la única levadura capaz de metabolizar y utilizar la lactosa como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno y fosfato dipotásico como factor de crecimiento.

Transcurridas las 48h se seleccionaron 6 cepas (L2a, L2b, G3a, L4a, L5a, G5b) las cuales presentaron un mayor crecimiento en el medio selectivo (fueron seleccionadas de acuerdo a la turbidez en el medio líquido). Posteriormente se realizó una dilución de 1:10 de cada una de las cepas seleccionadas.

Las muestras diluidas se sembraron en placas de medio sólido YM; luego de una incubación de 72 horas a 37°C, del total de cepas del cultivo inicial, se seleccionaron 6 cepas. Se realizaron diversos repiques para obtener las cepas puras. Después de haber realizado 8 repiques se obtuvieron cultivos de las 6 cepas seleccionadas, se observaron sus características. La dilución sirvió para obtener cepas más aisladas y separadas, así se pudo escoger las cepas con características deseadas. Se observó el crecimiento de colonias con características similares en cuanto a la textura pero de diferentes tamaños (Figura N°12). Posteriormente se procedió a evaluar morfológicamente cada placa.

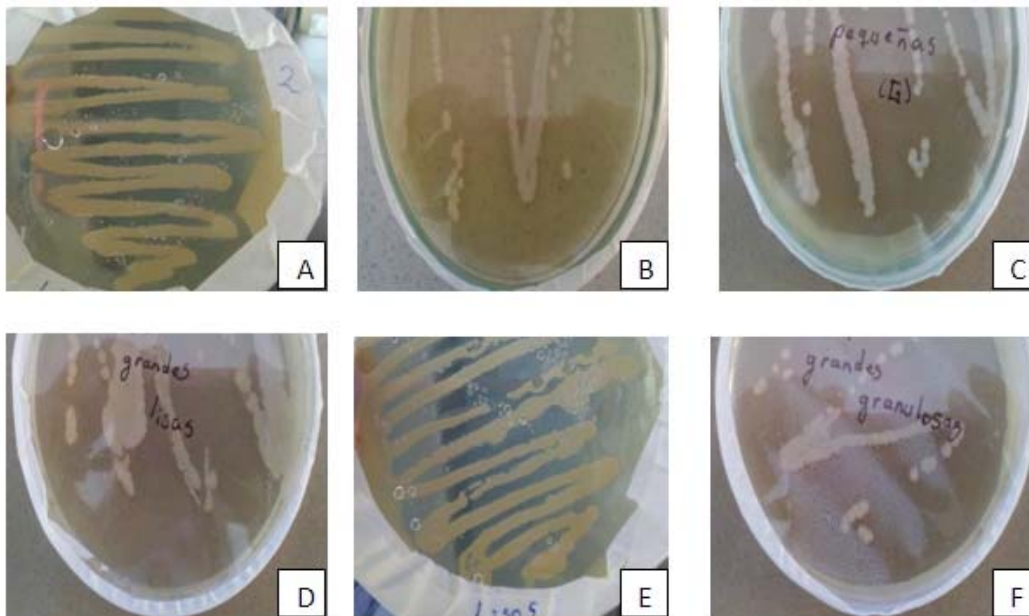


Figura N°12. Fotografías de las 6 cepas seleccionadas, cultivadas en medio MY a 37°C por 72 horas (A) Cepa L2a, (B) Cepa L2b, (C) Cepa G3a, (D) Cepa L4a, (E) Cepa L5a, (F) Cepa G5b.

Las cepas seleccionadas fueron identificadas microbiológica y bioquímicamente. Tienen como característica principal su consistencia cremosa, un tamaño de aproximadamente 1-5 mm y una coloración crema, dichas características son descritas en la Tabla N°18.

Tabla N°18. Características macroscópicas de las cepas aisladas del kéfir

N°	Cepa	Color	Forma	Superficie	Consistencia	Tamaño
1	L2a	Crema	Circular	Lisa	Cremosa	2-3 mm
2	L2b	Crema	Circular	Lisa	Cremosa	1-2 mm
3	G3a	Crema	Circular	Granulosa	Cremosa	4-5 mm
4	L4a	Crema	Circular	Lisa	Cremosa	2 mm
5	L5a	Crema	Circular	Lisa	Cremosa	2-3 mm
6	G5b	Crema	Circular	Granulosa	Cremosa	1-2 mm

Las seis cepas obtenidas presentaron características macroscópicas típicas del género *Kluyveromyces spp.* de acuerdo a la bibliografía, la cual nos indica que el crecimiento en medio YM del género *Kluyveromyces spp.* presenta colonias de color crema a marrón, de apariencia cremosa.

4.5. Caracterización Bioquímica y Morfológica de las colonias aisladas

4.5.1. Resultados de la Tinción Gram

Posteriormente se realizó la caracterización microscópica de las 6 cepas seleccionadas anteriormente, para lo cual cada una de las cepas fue colocada en un portaobjetos y se realizó la tinción de gram. Los portaobjetos fueron observados al microscopio óptico (100X), observándose levaduras en su mayoría gram positivas con una coloración azul violeta y una cepa gram negativa con una coloración rosácea (Tabla N°19). Los resultados se observan en la Figura N°13.

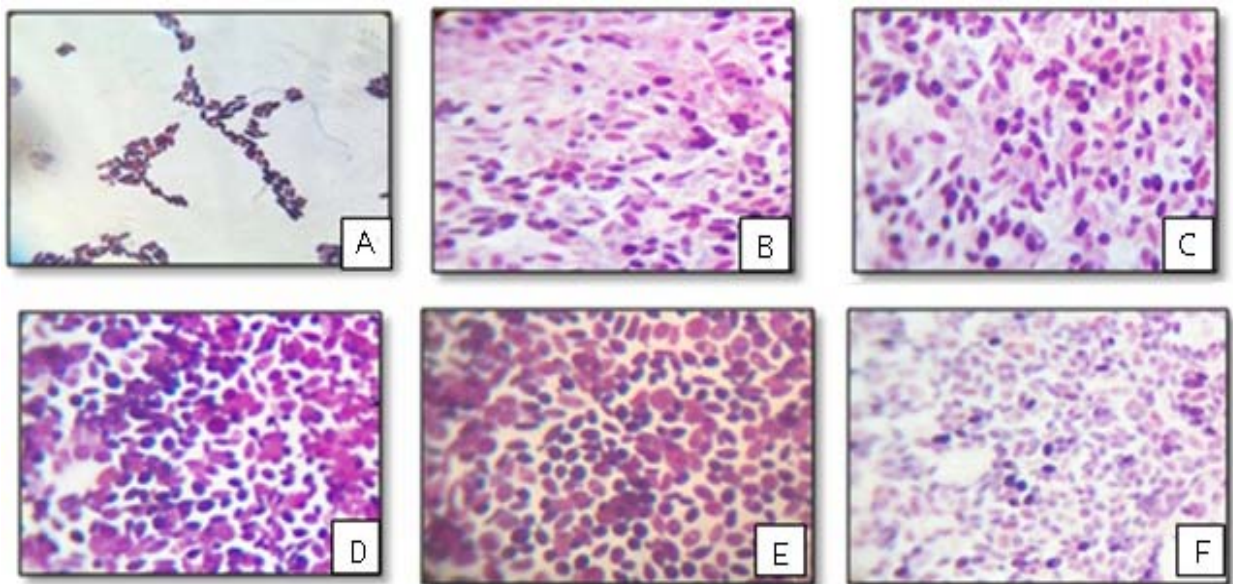


Figura N° 13. Observación microscópica a 100 x con coloración Gram de las 6 cepas seleccionadas. (A) Cepa L2a, (B) Cepa L2b, (C) Cepa G3a, (D) Cepa L4a, (E) Cepa L5a, (F) Cepa G5b.

Se realizó la tinción gram como primera prueba de identificación para las cepas aisladas, posteriormente se realizó pruebas bioquímicas para identificarlas.

Se puede observar en la Tabla N° 19 que el 100% de las cepas aisladas son levaduras por su morfología (forma ovoide): 83% gram positivas (L2a, L2b, G3a, L4a, G5b) y 17% gram negativas (L5a)

Tabla N°19. Caracterización microscópica mediante tinción GRAM de las seis cepas aisladas.

CEPA	FORMA CELULAR	GRAM
L2a	Ovoide	Positivas
L2b	Ovoide	Positivas
G3a	Ovoide	Positivas
L4a	Ovoide	Positivas
L5a	Ovoide	Negativas
G5b	Ovoide	Positivas

Resultados de las prueba bioquímicas realizadas

Se identificaron cada una de las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas. Todas las pruebas bioquímicas y sus resultados se presentan en la Tabla N°23.

a) Prueba TSI (Triple Sugar Iron ó Triple Azúcar Hierro)

Las cepas seleccionadas fueron sometidas a esta prueba y los resultados fueron los siguientes:

Tabla N° 20. Resultados de la prueba TSI para las seis cepas aisladas

L2a	L2b	G3a	L4a	L5a	G5b
A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Fermenta	Fermenta	Fermenta	Fermenta	Fermenta	Fermenta
todos los azúcares	todos los azúcares	todos los azúcares	todos los azúcares	todos los azúcares	todos los azúcares

Al realizar la prueba del TSI, se pudo evaluar la capacidad de las cepas de formar ácido. Para todas las cepas aisladas (L2a, L2b, G3a, L4a, L5a, G5b) se observó como resultado el pico y fondo amarillo lo cual indica que todas las cepas aisladas fermentan lactosa y glucosa. (Figura N°14.). Este medio nos permite investigar la degradación de cualquiera de los 3 azúcares presentes (lactosa, sacarosa y glucosa), se forman ácidos que hacen virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo (inicialmente el color del medio es rojizo). La degradación de la lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta), la sacarosa en la parte intermedia y la glucosa en la parte profunda.

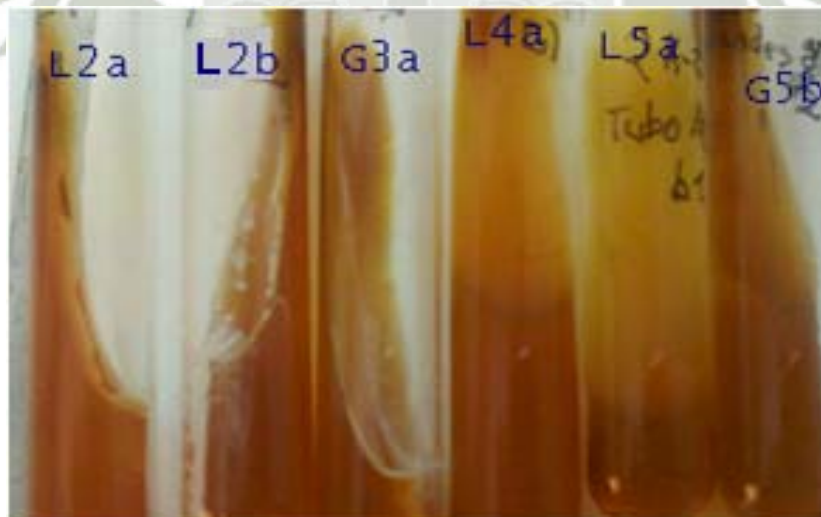


Figura N°14. Resultados de la prueba del TSI para las seis cepas aisladas.

b) Prueba Simmons Citrato Agar

Con las cepas seleccionadas se realizó esta prueba y los resultados se muestran en la Tabla N°21.

Tabla N° 21. Resultados de la prueba de citrato para las seis cepas aisladas

Cepa	Citrato	Color del medio
L2a	Negativo	Verde
L2b	Negativo	Verde
G3a	Negativo	Verde
L4a	Negativo	Verde
L5a	Negativo	Verde
G5b	Negativo	Verde

Todas las cepas aisladas (L2a, L2b, G3a, L4a, L5a, G5b) dieron como resultado negativo debido a que el color del citrato permaneció constante, lo cual nos indica que las cepas aisladas no tienen la capacidad de degradar el citrato por lo tanto el medio de cultivo no puede alcalinizarse⁽⁸⁴⁾. Los resultados se pueden observar en la Figura N°15.

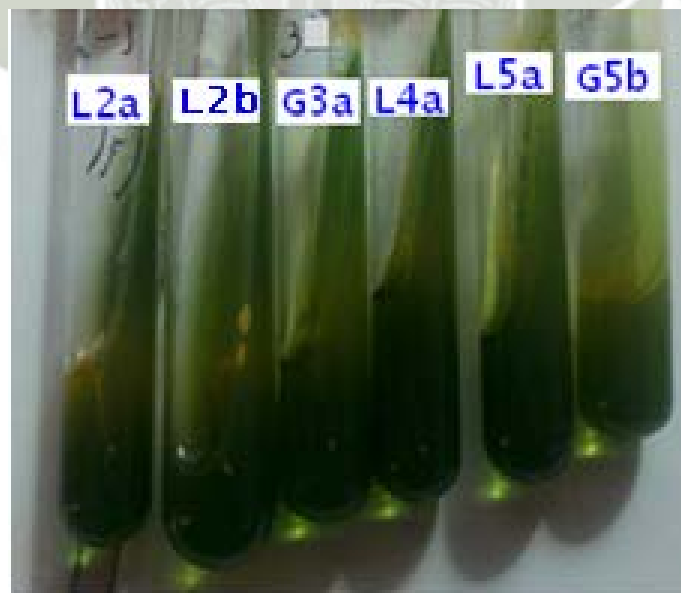


Figura N° 15. Resultado de la prueba del citrato para las cepas aisladas.

a) Fermentación de Azúcares

En este estudio fueron utilizadas las 6 cepas aisladas; las cepas fueron identificadas mediante la capacidad de fermentar azúcares como la maltosa, glucosa, galactosa, lactosa, para lo cual se utilizó el medio basal de fermentación y como indicador la solución de azul de bromotimol, el cual nos indica la capacidad de fermentación de azúcares mediante el cambio de color de azul verdoso a amarillo por acidificación del medio de fermentación. Para la fermentación de azúcares se utilizó los tubos de Durham. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura N°16.

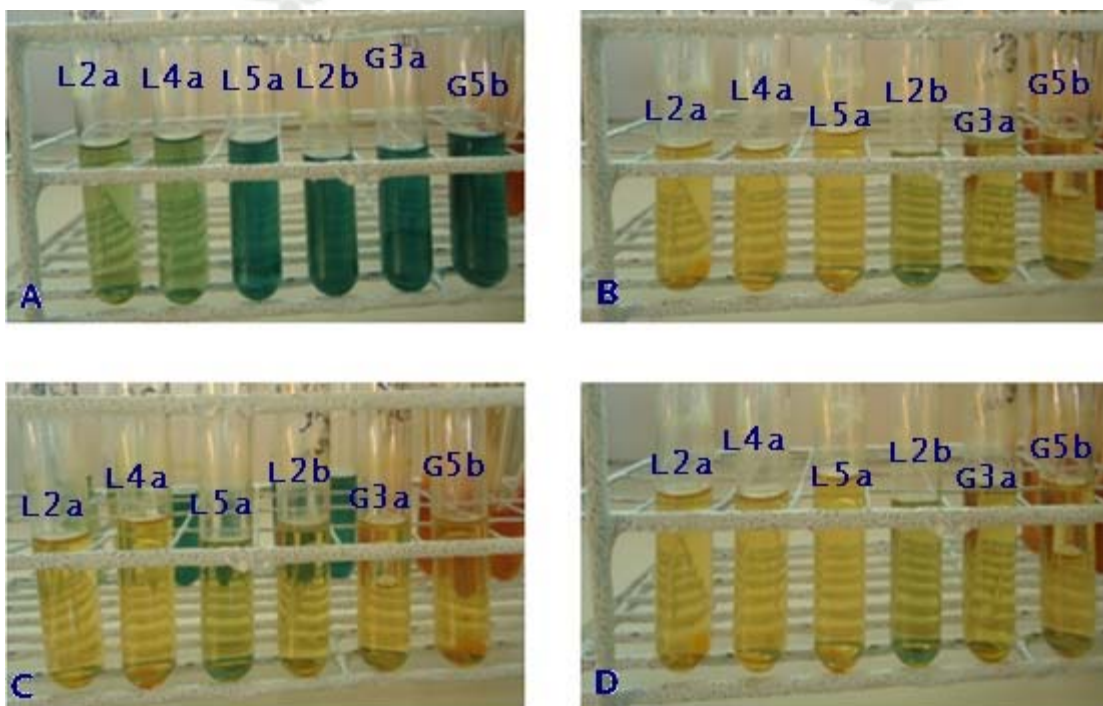


Figura N°16. Resultados de la fermentación de azúcares (A) fermentación de Maltosa (B) fermentación de Glucosa (C) fermentación de Galactosa (D) fermentación de Lactosa.

L2a y L4a fueron capaces de fermentar maltosa, sin embargo cuatro cepas (L5a, L2b, G3a, G5b) fueron incapaces de fermentar dicha azúcar (Figura N°16.a). Para las cepas L2a y L4a el color del medio cambió de azul verdoso a amarillo debido a la capacidad de fermentar maltosa, en cambio el color del medio que contenía las cepas L5a, L2b, G3a y G5b permaneció constante.

Todas las cepas (L2a y L4a, L5a, L2b, G3a, G5b) fueron capaces de fermentar Glucosa (Figura N°16.b), Galactosa (Figura N°16.c). y Lactosa (Figura N°16.d).

Tabla N°22. Resultados de la fermentación de azúcares.

Cepa	Maltosa	Glucosa	Galactosa	Lactosa
L2a	+	+	+	+
L4a	+	+	+	+
L5a	-	+	+	+
L2b	-	+	+	+
G3a	-	+	+	+
G5a	-	+	+	+

- **Determinación de Bioetanol 1.5 G**

Se determinó la producción cualitativa de etanol mediante el método del yodoformo

Las seis levaduras elegidas eran posibles productoras de etanol a partir de lactosuero, ya que formaron un precipitado de color amarillo. La prueba del yodoformo (CHI₃) se basa en la formación de este compuesto que se observa como un precipitado de color amarillo a partir de una reacción de halogenación en medio básico ⁽⁹⁵⁾. Al realizar la prueba a los tubos con las cepas aisladas se presentó un precipitado color amarillo laminado. (Figura N°17)

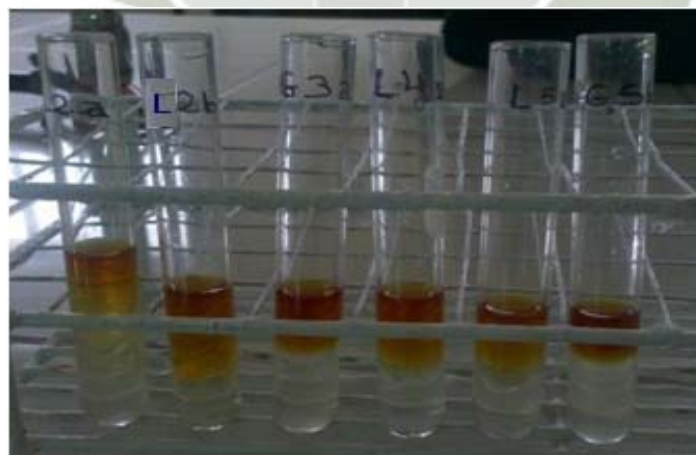


Figura N° 17. Determinación de bioetanol 1.5 G de las cepas aisladas, mediante el método del yodoformo.

Tabla N°23. Resumen de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las levaduras aisladas.

Fermentación de Azúcares							
Cepa	TSI	Citrato	Maltosa	Glucosa	Galactosa	Lactosa	Producción de etanol
L2a	A/A	-	+	+	+	+	+
L4a	A/A	-	+	+	+	+	+
L5a	A/A	-	-	+	+	+	+
L2b	A/A	-	-	+	+	+	+
G3a	A/A	-	-	+	+	+	+
G5a	A/A	-	-	+	+	+	+

Al realizar la tinción gram como primera prueba de identificación se observó la presencia de levaduras; según Romero en los gránulos de kéfir y en la leche fermentada se encuentran dos tipos de levaduras. Las fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*)⁽¹⁴⁾. Observando la Tabla N°23., que es la tabla resumen de las pruebas bioquímicas se puede observar que los resultados encontrados tienen relación con los reportados por varios estudios de aislamiento de levaduras a partir de kéfir, los cuales mencionan que especies del género *Kluyveromyces spp.* se encuentran en el kéfir, debido a que es el único género capaz de fermentar lactosa, como se puede observar todas las levaduras aisladas son capaces de fermentar lactosa.

Adicionalmente especies del género *Kluyveromyces spp.* se han reportado como productoras de etanol. Dichas investigaciones dan soporte a los resultados encontrados en este estudio, ya que se determinó que las cepas obtenidas eran capaces de producir etanol a partir del metabolismo de lactosa; el género *Kluyveromyces spp.* es el único capaz de realizar la conversión directa de lactosa a etanol, debido a que es capaz de producir la enzima β -galactosidasa que hidroliza lactosa en glucosa y galactosa⁽⁷⁾.

Se compararon las pruebas bioquímicas de todas las cepas aisladas con las reportadas por Kurtzman y col⁽⁹⁶⁾. De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas L5a, L2b, G3a, G5b podrían pertenecer al género *Kluyveromyces var. marxianus* ya que son capaces de fermentar

glucosa, galactosa pero incapaces de fermentar maltosa. Las cepas L2a y L4a podrían pertenecer al género *Kluyveromyces var. lactis*, debido a que esta levadura fermenta glucosa, galactosa, lactosa, pero puede fermentar o no maltosa es decir los resultados son variables para la fermentación de maltosa⁽⁹⁷⁾.

Tabla N°24. Tabla resumen de identificación de las levaduras aisladas

Codificación de la Cepa	Nombre de la levadura aislada
L2a	<i>Kluyveromyces lactis</i>
L4a	<i>Kluyveromyces lactis</i>
L5a	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
L2b	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
G3a	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
G5a	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

4.6. Recolección de muestras de lactosuero proveniente de empresas lácteas de la provincia de Arequipa

4.6.1. Obtención de la muestra de lactosuero

La recolección de muestra de lactosuero se realizó en el mes de abril del 2013. Se recolectó 14L de muestra de lactosuero producto de la elaboración del queso parmesano procedente de la empresa “LAIVE S.A” la muestra obtenida tuvo una temperatura de 25°C. Se realizó el transporte de las muestras y se conservaron a -4°C hasta su posterior uso.

4.7. Determinación de las características Físicoquímicas del lactosuero.

Posteriormente se la muestra de lactosuero fue llevada a las instalaciones del Laboratorio Veterinario del Sur “LABVETSUR” donde realizaron la determinación de pH, materia grasa, densidad, lactosa, sólidos totales y proteínas utilizando el equipo Lactoscan. La certificación proporcionada se puede observar en el Anexo 8.

Tabla N°25. Parámetros fisicoquímicos del lactosuero.

Característica	Lactosuero Fresco
pH	4,8
Materia grasa g/100	0,57
Densidad g/cc a 15°C	1,022
Sólidos Totales g/100 (%)	6,37
Proteínas g/100 (%)	2,15

Se compararon los valores obtenidos con los resultados de la Tabla N°5. Los valores obtenidos en esta investigación salieron ligeramente del promedio, una posible causa es la diferencia del tipo de leche del cual proviene el lactosuero, ya que la calidad de la leche es diferente y con muchos más nutrientes en nuestra región, otra posible causa sea el proceso en la elaboración del queso de partida.

- **Determinación de Lactosa**

- a) **Elaboración de la curva de Calibración**

Con el propósito de determinar la cantidad de lactosa presente en el lactosuero se utilizó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico, para lo cual se preparó la curva de calibración por triplicado. Los datos en extenso se muestran en el Anexo 2.

La curva de calibración para determinar la lactosa mostrada en la Figura N°18. fue construida empleando seis concentraciones conocidas de lactosa (0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1 g/L) y un blanco, se puede observar en color azul la línea de tendencia construida para el modelo lineal observándose un buen ajuste de los datos, por su parte las cotas de color rojo muestran los límites al 95.0% de confianza.

La ecuación del modelo ajustado para lactosa (Ec.5) se muestra a continuación.

$$\text{Concentración Lactosa} = -0.00211745 + 0,163548 * \text{Absorbancia} \quad (\text{Ec.5})$$

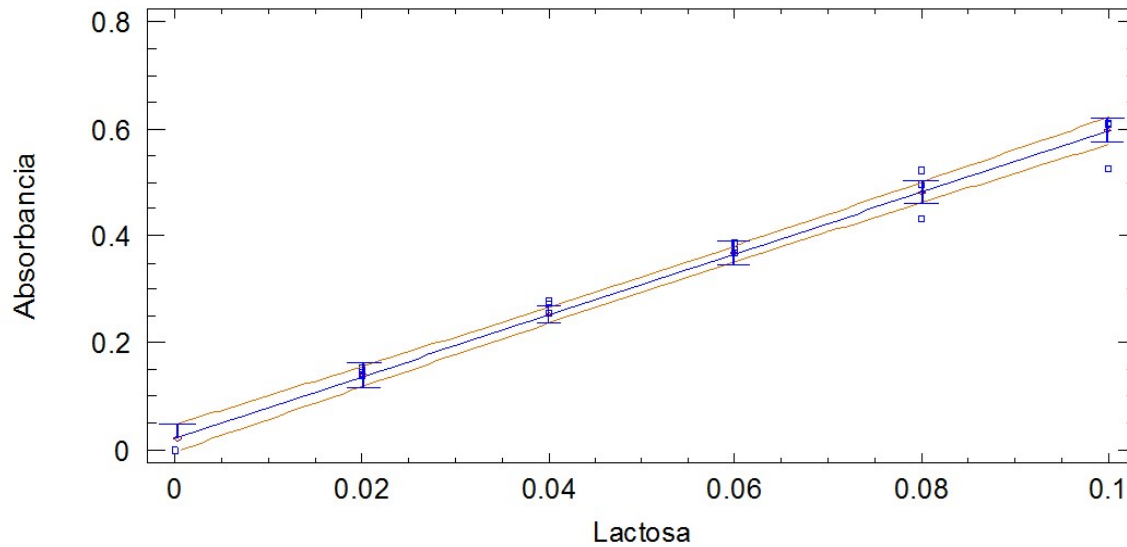


Figura N° 18. Curva de calibración para la evaluación de lactosa (g/L).

Posteriormente se utilizó la curva de calibración y se realizaron los cálculos respectivos para determinar la cantidad de lactosa presente en el lactosuero, obteniendo una cantidad de 28,9g/L.

4.8. Tratamiento del suero de leche

Se realizó un tratamiento termoácido para separar las proteínas coagulables del suero de leche. Después de realizar el tratamiento termoácido y de realizar dos filtraciones, se tomaron dos muestras de 50 ml cada una las cuales fueron llevadas a las instalaciones del Laboratorio Veterinario del Sur “LABVETSUR”, en el cual analizaron las muestras utilizando el equipo Lactoscan para determinar los parámetros fisicoquímicos (La certificación proporcionada se puede observar en el Anexo 8), la cantidad de lactosa fue determinada mediante el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico.

La curva de calibración para la determinación de lactosa se muestra en la Figura N°18, los resultados se muestran en la Tabla N°26.

Tabla N° 26. Parámetros fisicoquímicos del lactosuero tratado.

Característica	Lactosuero Fresco	Primer Filtrado	Segundo Filtrado
pH	4,8	5,45	6,05
Materia grasa g/100	0,57	0,39	0
Densidad g/cc a 15°C	1,022	1,0212	1,0182
Lactosa g/L	28,9	28,5	28,2
Sólidos Totales g/100 (%)	6,37	5,73	5,7
Proteínas g/100 (%)	2,15	1,99	1,94

El lactosuero tratado fue utilizado para la preparación del medio de fermentación cuya composición se muestra en la Tabla N° 12.

4.9. Cinética de crecimiento, consumo de Lactosa y producción de Bioetanol de las cepas seleccionadas.

- **Determinación producción de Bioetanol 1.5 G**

a) Elaboración de la curva de Calibración

La producción de bioetanol 1.5G en los sistemas estudiados fue realizada mediante métodos espectrofotométricos como el método del dicromato de potasio, siendo necesaria la construcción de una curva de calibración la cual se realizó por triplicado. Los datos en extenso se muestran en el Anexo 3. La curva de calibración para bioetanol 1.5G mostrada en la Figura N° 19. fue construida empleando seis concentraciones conocidas de etanol (10, 20, 40, 50, 60, 70 g/L) y un blanco, se puede observar en color azul la línea de tendencia construida para el modelo lineal observándose un buen ajuste de los datos los cuales presentaron un coeficiente de correlación de 0,9990 y un R^2 de 99,8115 con un error estándar

de 0,0092, por su parte las cotas de color rojo muestran los límites al 95,0% de confianza. La ecuación del modelo ajustado para bioetanol (Ec. 6) se muestra a continuación.

$$\text{Absorbancia Bioetanol} = 0.00890068 + 0,00830011 * Cc \text{ Bioetanol} \quad (\text{Ec.6})$$

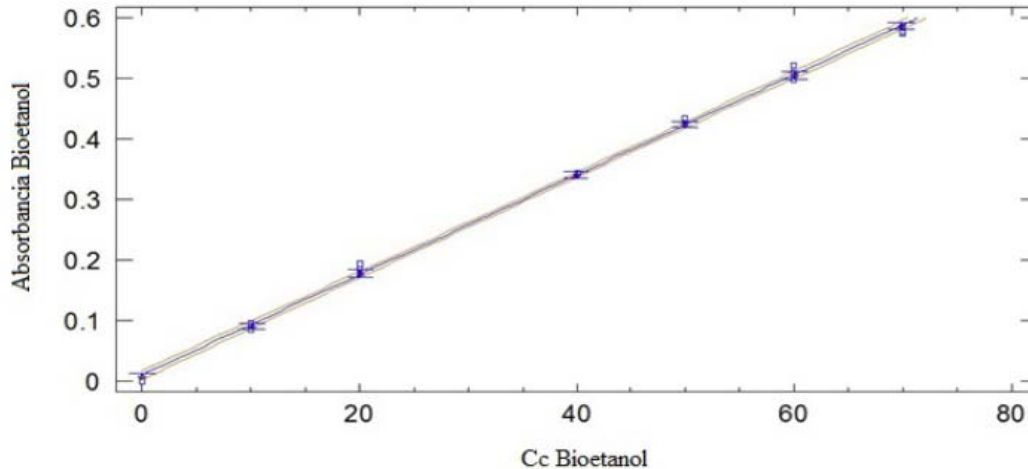


Figura N° 19. Curva de calibración para la evaluación de Bioetanol 1.5 G (g/L)

Para poder seleccionar las cepas de *Kluyveromyces* más eficientes se utilizó el medio de fermentación cuya composición se muestra en la Tabla N°12.

Se evaluó la producción de bioetanol 1.5G para lo cual se utilizó el método del dicromato de potasio (se utilizó la curva de calibración que se muestra en la Figura N°19); el consumo de lactosa (utilizando el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico, cuya curva de calibración se puede observar en la Figura N° 18.) y la producción de biomasa en g/L de las seis cepas aisladas denominadas como *L2a*, *L4a*, *L5a*, *L2b*, *G3a* y *G5b*, tal y como se muestra en la Figura N°20. El desarrollo de las lecturas fueron hechas por triplicado. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del programa computacional Statgraphics Centurion X4, para los datos obtenidos en la producción de biomasa, consumo de lactosa y producción de bioetanol 1.5 G. Primero se realizó la prueba ANOVA, para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada cepa aislada. Al determinar el valor de $P < 0,05$, concluimos que sí existe diferencia significativa entre las cepas aisladas, y se realizó el test de Tuckey para agruparlos según sus diferencias.

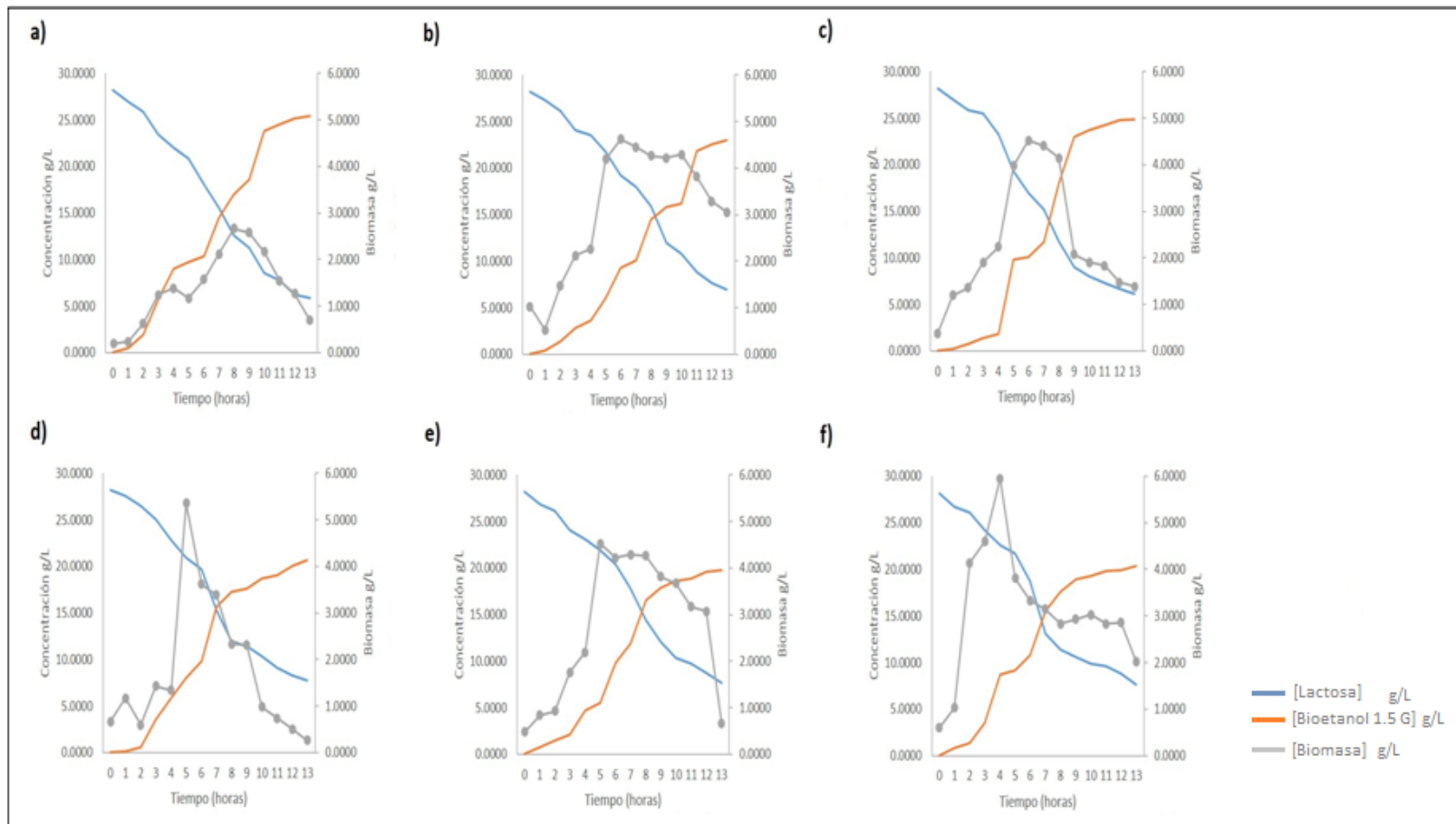


Figura N° 20. Cinética de consumo de lactosa, producción de Bioetanol 1.5G y crecimiento de biomasa para seis cepas aisladas de Kéfir.

a) L2a, b) L4a, c) L5a, d) L2b, e) G3a y f) G5b

En la figura N° 20-a se puede observar el crecimiento de biomasa de la cepa L2a, dicho crecimiento es mínimo con respecto a las demás cepas aisladas, se obtuvo un crecimiento máximo de 2,6667 g/L a un tiempo de 8 horas, en cuanto al consumo de lactosa llegó a 5,8780 \pm 0,6810 de lactosa sin consumir a un tiempo de 13 horas de fermentación, la producción de bioetanol 1.5 G llegó a 25,3705 \pm 0,0318 g/L, esta cepa es la que tuvo una mayor producción de bioetanol 1.5 G y mayor consumo de lactosa con respecto a las demás cepas aisladas.

En la Figura N° 20-b se aprecia el crecimiento de biomasa de la cepa L4a, dicho crecimiento alcanzó una concentración máxima a un tiempo de 7 horas con una concentración de 4,4524 g/L también se observó una disminución paulatina de la biomasa, con respecto al valor de lactosa residual fue de 6,9183 \pm 2,1226 g/L, la producción de bioetanol 1.5 G a un tiempo de 13 horas fue de 22,959 \pm 0,1779. En la figura N° 20-c se muestra la gráfica de la cinética de la cepa L5a, en la cual se puede observar que la producción de biomasa tuvo un máximo a un tiempo de 7 horas con una producción de 4,4048 g/L, el valor de lactosa residual fue de 6,1743 \pm 0,4469 y la producción de bioetanol 1.5 G alcanzó un valor de 24,8420 \pm 0,5845, esta es una de las cepas con mayor producción de bioetanol 1.5G.

En la Figura N° 20-d se observan las gráficas de producción de biomasa, consumo de lactosa y producción de bioetanol 1.5 G de la cepa L2b, la producción de biomasa tuvo una máxima concentración a un tiempo de 5 horas con 5,3571 g/L, dicha concentración fue disminuyendo con gran rapidez, el consumo de lactosa residual fue paulatina teniendo como resultado final 7,7590 \pm 0,7535 g/L de lactosa residual, una producción de 20,6410 \pm 0,0253 g/L de bioetanol 1.5 G en un tiempo de 13 horas.

La Figura N°20-e muestra la cinética de producción de biomasa de las cepa G3a la cual alcanza una máxima producción en un tiempo de 5 horas con 4,5238 g/L posteriormente la concentración de biomasa va disminuyendo lentamente hasta llegar a una concentración de 0,6667 g/L a un tiempo de 13 horas, la concentración de lactosa residual a las 13 horas fue de 7,6710 \pm 0,8939, la producción de bioetanol 1.5 G fue de 19,7860 \pm 0,0381 g/L, el consumo de lactosa y producción de bioetanol 1.5 G fue constante. En la Figura N° 20-f se aprecia una concentración máxima de 5,9524 g/L a un tiempo de 4 horas correspondiente a la cepa G5b, posteriormente la concentración disminuye rápidamente hasta obtener una concentración de 2,0238 g/L a un tiempo de 13 horas, se obtuvo también una concentración

de lactosa residual de $5,8780 \pm 0,6810$ g/L y una producción de bioetanol 1.5 G de $20,4015 \pm 0,0698$.

El consumo de lactosa es directamente proporcional a la producción de bioetanol 1.5G. Se puede observar un comportamiento similar en cuanto al consumo de lactosa por parte de las seis cepas estudiadas llegando a valores cercanos a cinco g/L de lactosa sin consumir a tiempo de 13 horas de fermentación; por su parte la producción de etanol por parte de las cepas *Kluveromyces spp.* pese a que presentó similar tendencia, se diferenció en la concentración final alcanzada por las cepas L2a y L5a las cuales registraron una concentración de aproximadamente 25g/L de bioetanol 1.5G tal y como se observa en las Figuras N° 20-a y 20-c; las demás cepas solo permitieron alcanzar concentración de aproximadamente 20 g/L. En cuanto al desarrollo de biomasa cada cepa presentó su propia cinética de crecimiento mostrando un pico máximo y luego una disminución paulatina de biomasa en menor o mayor rapidez dependiendo de la cepa.

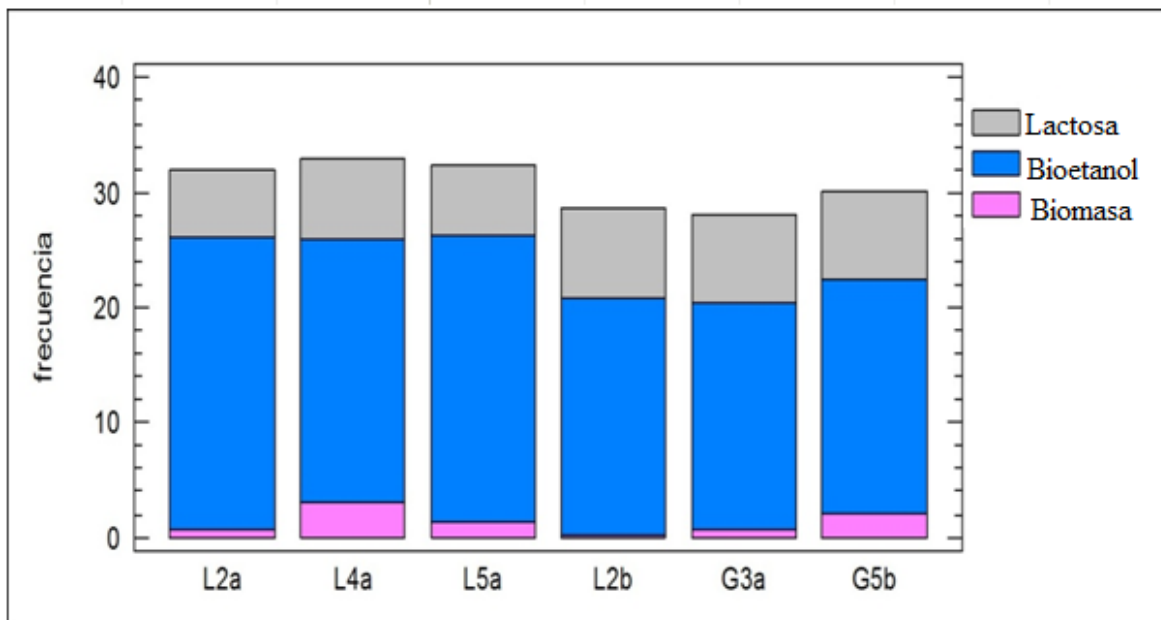


Figura N° 21. Diagrama de barras para comparación de consumo de lactosa, producción Bioetanol 1.5 G y crecimiento de biomasa a un tiempo de 13 horas para las seis cepas en estudio.

En la Figura N° 21. se muestra un diagrama de barras de frecuencia acumulada en la cual se puede observar claramente la variación de los parámetros de consumo de lactosa en la cual las cepas L2a, L5a y G5b son las que tuvieron un mayor consumo de lactosa, en cuanto a la producción de bioetanol 1.5 G las cepas con mayor capacidad de producción fueron L2a y L5a, también se analizó el crecimiento de biomasa en la que se observa que la cepa L2b fue la que tuvo la mayor disminución de biomasa y la cepa L4a fue la que tuvo la mayor producción de biomasa en comparación con las demás cepas, los resultados fueron obtenidos en un tiempo de 13 horas, los parámetros fueron analizados para las 6 cepas seleccionadas. Los datos en extenso se muestran en el Anexo 4.

Por los motivos expuestos anteriormente se recurrió a realizar un análisis de varianza y la respectiva prueba de Tuckey para identificar la posible presencia significativa entre cepa y cepa y de esta manera proceder a la selección.

Tabla N°27. Análisis de varianza para la producción de Bioetanol 1.5 G de seis cepas aisladas de Kéfir

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	58,4702	5	11,694	470308,11	0,0000
Intra grupos	0,000149188	6	0,0000248646		
Total (Corr.)	58,4703	11			

En la Tabla N° 27. se puede observar una razón F de 470308,11 que indica la fuerte diferencia entre las cepas estudiadas, puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05(P=0,00) con la prueba ANOVA, se confirma que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de producción de etanol en g/L de las seis cepas con un 95,0% de confianza, por lo que se procedió a realizar la prueba de Tuckey, para agrupar las muestras, según su diferencia.

Tabla N°28. Comparación de la concentración de Bioetanol 1.5 G en g/L a tiempo 13 horas

	L2a	L4a	L5a	L2b	G3a	G5b
Promedio	25,3707+/ -0,0337 ^a	22,9476+/ -0,0301 ^b	24,8919+/ -0,0527 ^c	20,6408+/ -0,0281 ^d	19,7859+/ -0,0366 ^e	20,4014+/- 0,0712 ^f
Error estándar	0,0026	0,0023	0,0041	0,0022	0,0028	0,0056
Desviación estándar	0,0037	0,0033	0,0058	0,0031	0,004	0,0079

*Las letras a lado de los valores presentados en la tabla indican la división de grupo, según la prueba de Tuckey (P<0,05)

En la Tabla N° 28. se compara la producción de bioetanol 1.5G en g/L de las seis cepas en un tiempo de 13 horas, reportando el promedio de las seis cepas estudiadas, el error estándar y la desviación estándar de cada una de ellas. Mediante la prueba de múltiples rangos de Tuckey se evidencia que todos los microorganismos pertenecen a un grupo distinto por lo cual cada cepa está representada por diferentes letras, concluyendo así que los seis grupos son estadísticamente diferentes entre sí. En la Figura N° 22. se observa el promedio de producción de Bioetanol 1.5 G, se aprecia la diferencia entre cada una de las cepas y la que existe entre cada una de las repeticiones realizadas para cada cepa, en este caso se observa que las cepas L2a y L5a son las que muestran claramente la mayor producción de Bioetanol 1.5 G, con 25,3707+/-0,0337 y 24,8919+/-0,0527 respectivamente, por este motivo las cepas L2a y L5a fueron seleccionadas para ser utilizadas en la siguiente etapa.

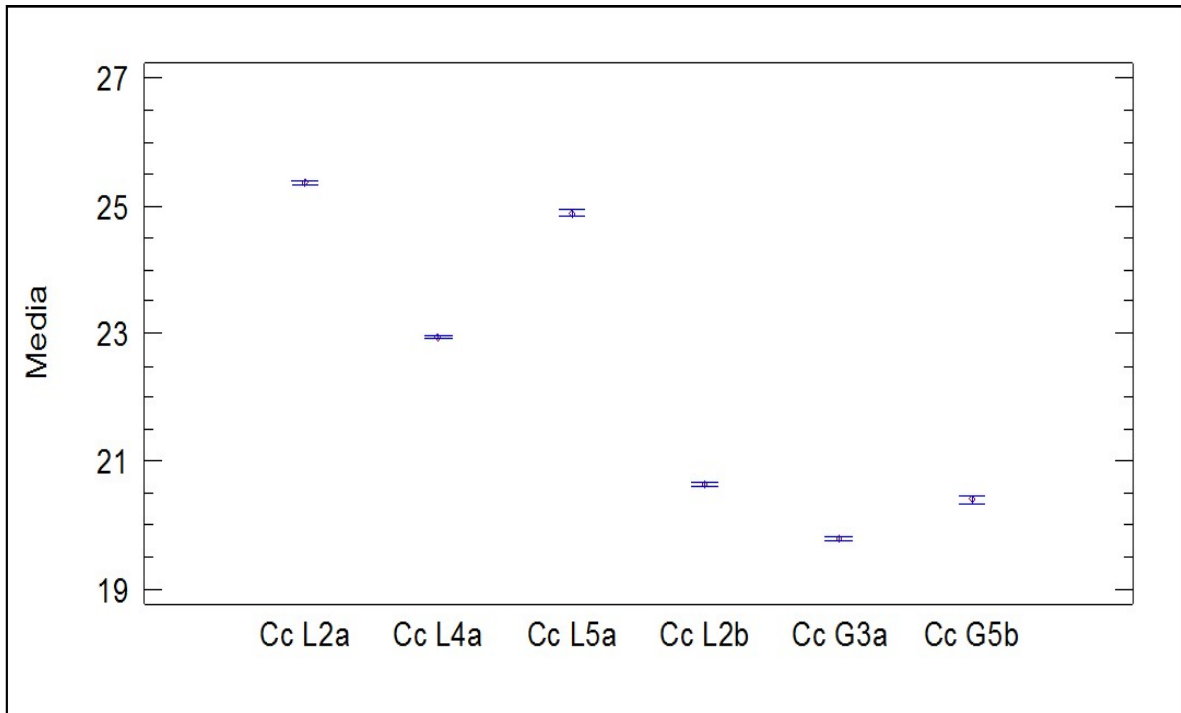


Figura N° 22. Comparación de promedio de producción de Bioetanol 1.5 G en g/L para las seis cepas en estudio a un tiempo de 13 horas.

Por los resultados expuestos, se concluyó que las cepas L2a y L5a fueron las cepas con mayor eficiencia ya que tuvieron una mayor producción de bioetanol 1.5G y mayor consumo de lactosa, en un tiempo de 13 horas, a una temperatura de 37°C con una agitación de 100 rpm. La asimilación de la lactosa como fuente de carbono por levaduras del género *Kluyveromyces spp.*, es capaz de realizar la conversión directa de la lactosa en etanol, realizando la fermentación de lactosa ya que tiene la capacidad de producir la enzima B-galactosidasa, que hidroliza lactosa en glucosa y galactosa. Todavía, esta levadura presenta problemas de inhibición de etanol ⁽⁷⁾. Las levaduras pertenecientes al género *Kluyveromyces spp.*, son levaduras respiro-fermentativa pudiendo generar energía, a través del ciclo de krebs (ciclo del ácido cítrico) o por fermentación en etanol⁷, es capaz de de realizar simultáneamente fermentación y respiración, siendo el equilibrio entre estas dos vías. Un suceso importante en el proceso de fermentación y la capacidad de levadura para soportar los efectos tóxicos del etanol producido ⁽¹⁰⁾.

4.10. Balance Estequiométrico para la producción de Bioetanol 1.5 G

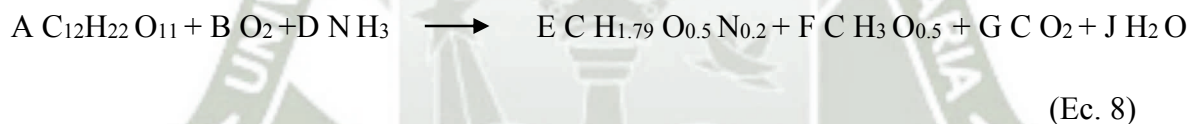
- **Balances elementales**

Los balances elementales permiten relacionar al sistema biológico con la descripción matemática de la siguiente manera:

Se propone una biorreacción como la presentada en la Ec. (7) para estimar los coeficientes mediante un balance estequiométrico para la producción de Bioetanol 1.5G. Asumiendo la composición elemental promedio de microorganismos $C H_{1.79} O_{0.5} N_{0.2}$ ⁽⁹⁸⁾.



La ecuación elemental del proceso de producción de Bioetanol 1.5 G a partir de lactosuero es la siguiente:



Los datos utilizados fueron obtenidos de la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces spp.* La fuente de carbono ($C_{12} H_{22} O_{11}$) corresponde a lactosa proveniente del lactosuero, Oxígeno y extracto de levadura utilizado como sustrato nitrogenado. De este modo, las tasas medidas son sustrato (lactosa), O_2 , sustrato nitrogenado (extracto de levadura), biomasa ($C H_{1.79} O_{0.5} N_{0.2}$), etanol ($C H_3 O_{0.5}$), CO_2 y H_2O .

Balances elementales en mol:

$$\checkmark \text{ Carbono: } E+F+G-12=0 \quad \text{(Ec.9)}$$

$$\checkmark \text{ Hidrógeno: } 3D-1.79E-3F-2J+22=0 \quad \text{(Ec.10)}$$

$$\checkmark \text{ Oxígeno: } 2B-0.5E-0.5F-2G-J+11=0 \quad \text{(Ec.11)}$$

$$\checkmark \text{ Nitrógeno: } D-0.2E=0 \quad \text{(Ec.12)}$$

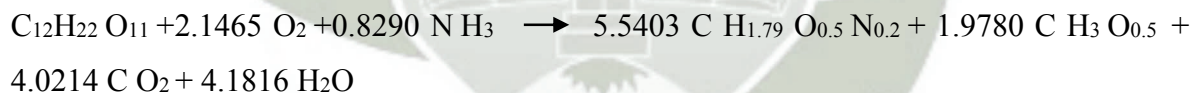
Donde A, B, D, E, F, G, J corresponden a los coeficientes estequiométricos.

En la (Ec.8) se utiliza la composición elemental de la biomasa $C H_{1.79} O_{0.5} N_{0.2}$ ⁽⁹⁸⁾ y $C_{12}H_{22}O_{11}$ que es la composición elemental para la lactosa utilizada como sustrato en la fermentación. Al aplicar balances elementales a la (Ec. 8) se obtiene un sistema algebraico definido. Se muestran los valores y las unidades de los coeficientes obtenidos utilizando una hoja de Microsoft Excel con macros en visual basic ⁽⁹¹⁾, en el cual dichos balances fueron resueltos formando una matriz elemental. La hoja de cálculo utilizada fue estequiometria microbiana.xlsx. en Microsoft Excel 2007, cuyos resultados se visualizan en el Anexo 5.

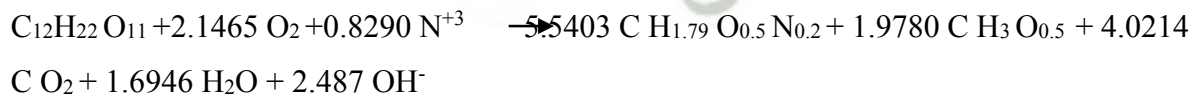
Los valores obtenidos para los coeficientes en el balance estequiométrico utilizando una hoja de Microsoft Excel con macros en visual basic fueron:

- ✓ A: 1
- ✓ B: 2.1465
- ✓ D: 0.8290
- ✓ E: 5.5403
- ✓ F: 1.9780
- ✓ G: 4.0214
- ✓ J: 4.1816

Reemplazando los coeficientes en la ecuación elemental se obtiene la siguiente ecuación balanceada estequiométricamente:



Al obtener la ecuación balanceada, la molécula de H_2O fue descompuesta en H^+ y OH^- , posteriormente se simplificó con los H^+ del sustrato nitrogenado. Obteniendo la siguiente ecuación:



Al finalizar el balance estequiométrico se observa que por cada mol de lactosa se obtiene 1.97 C-mol de Bioetanol 1.5 G o 0.985 de C_2H_5OH .

4.11. Comparación entre dos sistemas de fermentación: con soporte y sin soporte en un reactor Batch.

La producción de bioetanol 1.5G se determinó mediante la comparación de dos sistemas de fermentación, un sistema con soporte de inmovilización y otro sistema sin soporte de inmovilización.

Una vez seleccionadas las cepas se procedió a preparar los sistemas de fermentación sin soporte y con soporte; para el sistema de fermentación con soporte se procedió a realizar el semillero, para lograr que las levaduras elegidas (L2a y L5a) se adhieran a las pepas de aceituna las cuales fueron utilizadas como soporte de inmovilización; posteriormente se realizó un estudio por microscopía electrónica realizada en la Universidad San Agustín de Arequipa; en el cual se pudo observar la superficie de las pepas de aceituna sin presencia de levaduras (Figura N°23-A), en la Figura N°23-B puede observar la distribución de las levaduras elegidas (L2a y L5a) a lo largo de la superficie de las pepas de aceituna con un aumento de 167x, en la Figura N°23-C se puede observar las levaduras apelmazadas en una parte de la superficie de la pepa de aceituna con un aumento de 631x, en la Figura N°23-D se puede observar otra área de la superficie de la pepa de aceituna en la cual se encuentran las levaduras distribuidas de manera uniforme en la superficie de la pepa de aceituna a un aumento de 669x. En la Figura N°23-E se puede observar una mayor cantidad de levaduras, las cuales adheridas a la superficie, se observa también una parte de las levaduras apelmazadas, se puede observar mejor la morfología de las levaduras debido al aumento (1337x). Se observó la presencia de una abundante cantidad de levaduras adheridas en la superficie del soporte de inmovilización, dichas levaduras presentaban distinta longitud y tamaño. Esto se evidencia claramente en las fotografías de menor aumento (Figura N° 23.).

Las fotografías realizadas por el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de San Agustín fueron:

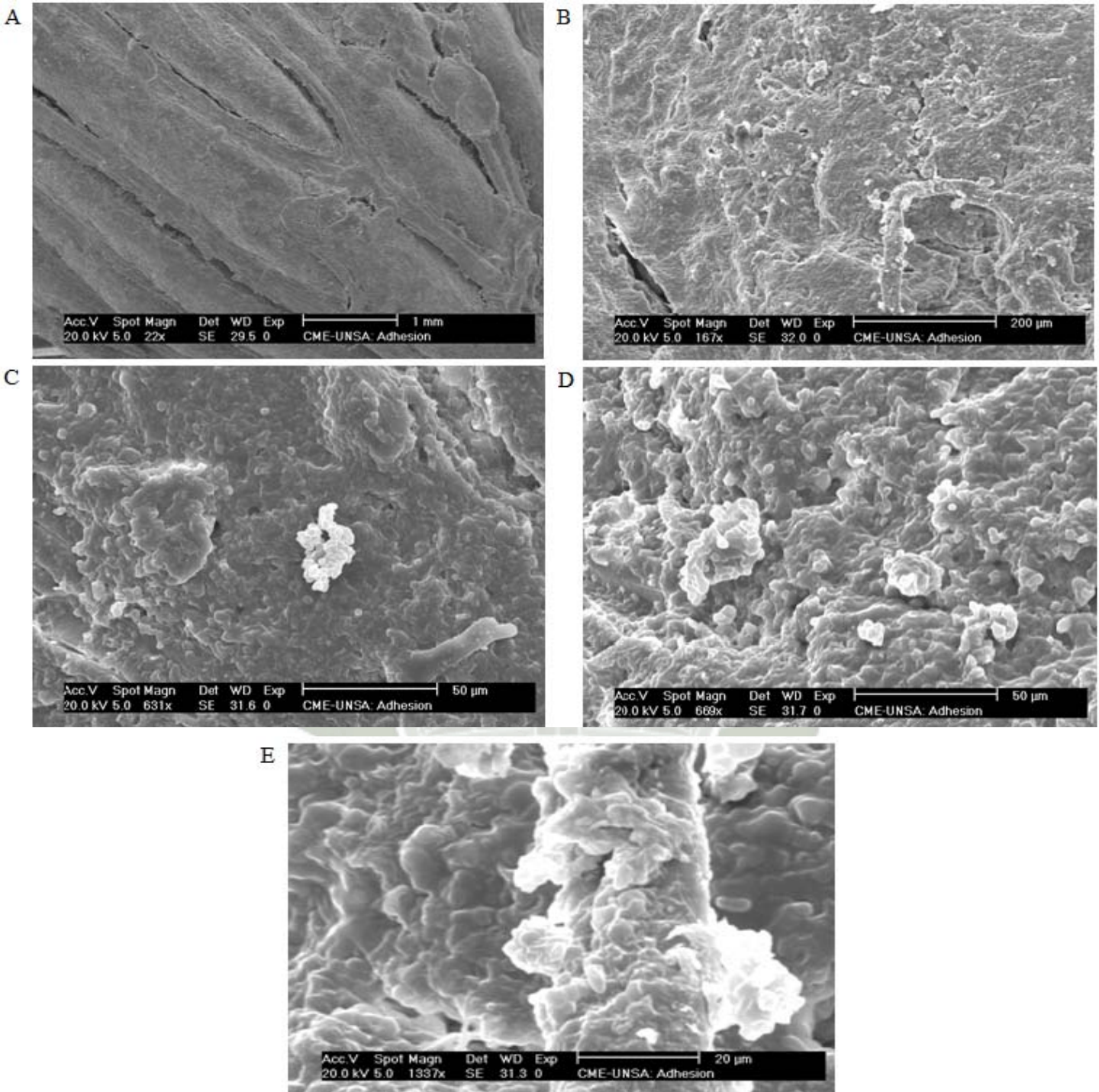


Figura N°23. Microscopía electrónica de la superficie de pepas de aceituna utilizadas como soporte de inmovilización. El aumento se indica al pie de cada fotografía.

Las levaduras seleccionadas (L2a y L5a) se adherieron a la superficie de la pepa de aceituna debido a que estas presentan un área de adherencia y porosidad, además que se realizó un tratamiento térmico al soporte (pepas de aceituna), la cual consistió en calentar las pepas a una temperatura de 80°C para generar una mayor porosidad aumentando así la superficie. Germeiner y colaboradores (1994) ⁽⁹⁹⁾, demostraron que las matrices orgánicas tienen mayor adsorción de la que pueden brindar las matrices sintéticas. Esto se debe a que los materiales orgánicos tienen mayor cantidad de grupos radicales como amino, carboxil, entre otros; así como una mayor cantidad de nutrientes, lo cual permite una adherencia y crecimiento más eficaz. El no ser tóxico, ni reactivo, así como su bajo costo, permite que sea usado ampliamente en la inmovilización de microorganismos como las pepas de aceituna.

Posteriormente se procedió a evaluar y comparar la producción de bioetanol 1.5G en un reactor Batch sin soporte y con soporte de inmovilización Anexo 6, para lo cual se utilizó el lactosuero suplementado como medio de fermentación y aceite de soya como solvente de extracción de bioetanol, a tiempo de 20 horas de fermentación. El ensayo fue realizado por triplicado y los valores de producción en g/L son mostrados en el Anexo 6.

a) Determinación de Bioetanol 1.5G en la fase Acuosa:

Se evaluó la producción de bioetanol 1.5G en la fase acuosa para lo cual se utilizó el método del dicromato de potasio y se utilizó la curva de calibración que se muestra en la Figura N°19.

Tal y como se muestra en la Figura N°24, la producción de bioetanol 1.5G en ambos reactores fue similar; para la elaboración de las curvas se transformó la respuesta de producción de bioetanol 1.5G elevándolo al cuadrado obteniendo un R^2 para el reactor sin soporte de 98,88% y para el reactor con soporte de 96,67%. Los datos en extenso se muestran en el Anexo 6.

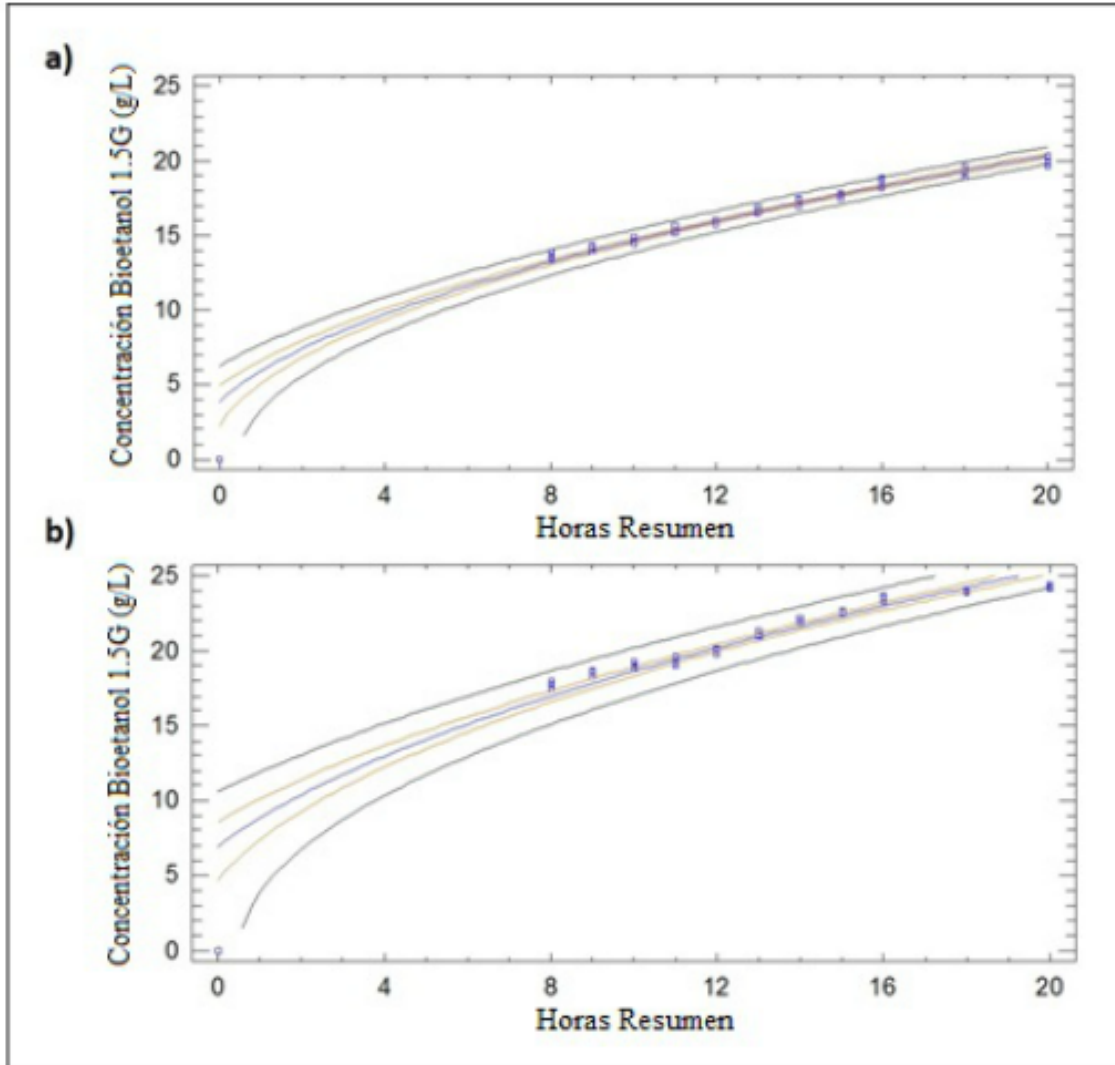


Figura N° 24. Producción de Bioetanol 1.5 G en reactores tipo Batch. a) Sistema de fermentación sin soporte, b) Sistema de fermentación con soporte de inmovilización.

En la figura N° 24, se observa los intervalos de confianza (bandas rojas) y las bandas externas son los límites de predicción los cuales nos indican que tan exacta sería una predicción de un nuevo valor. Se muestra gráficamente los promedios de la producción de etanol en g/L en un tiempo de 20 horas (después de 8 horas de fermentación se obtuvieron las muestras utilizadas en este estudio, las cuales fueron obtenidas durante 12 horas consecutivas), en los dos reactores construidos, identificando una producción de etanol de $19,9102 \pm 0,6032$ y $23,9569 \pm 1,0591$ (fase acuosa), en reactores sin soporte y con soporte respectivamente. Los datos en extenso se muestran en el Anexo 6. Gráficamente se evidenció la diferencia de

promedios tal y como se muestra en la Figura N° 24, en la cual se puede observar sin embargo fue necesario realizar una prueba *t-Student* la cual brindo un valor-p de 0,000139471, lo cual indica que si existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos promedios con un 95,0% de confianza.

Tabla N°29. Comparación de la concentración de Bioetanol 1.5 G en g/L a tiempo 20 horas para reactores sin y con soporte

	Sin soporte	Con soporte
Promedio	19,9102 +/- 0,6032	23,9569 +/- 1,0591
Varianza	0,0589552	0,181778
Desviación Estándar	0,242807	0,426355

En la Tabla N°29 se realizó una comparación de la concentración de Bioetanol 1.5G en la fase acuosa, entre el sistema de fermentación sin soporte en el cual se obtuvo 19,9102 +/- 0,6032 g/L y el sistema de fermentación con soporte en el cual se obtuvo 23,9569 +/- 1,0591 g/L, con lo cual se puede observar que el uso del soporte de inmovilización influye en la producción de Bioetanol 1.5G en el sistema de fermentación.

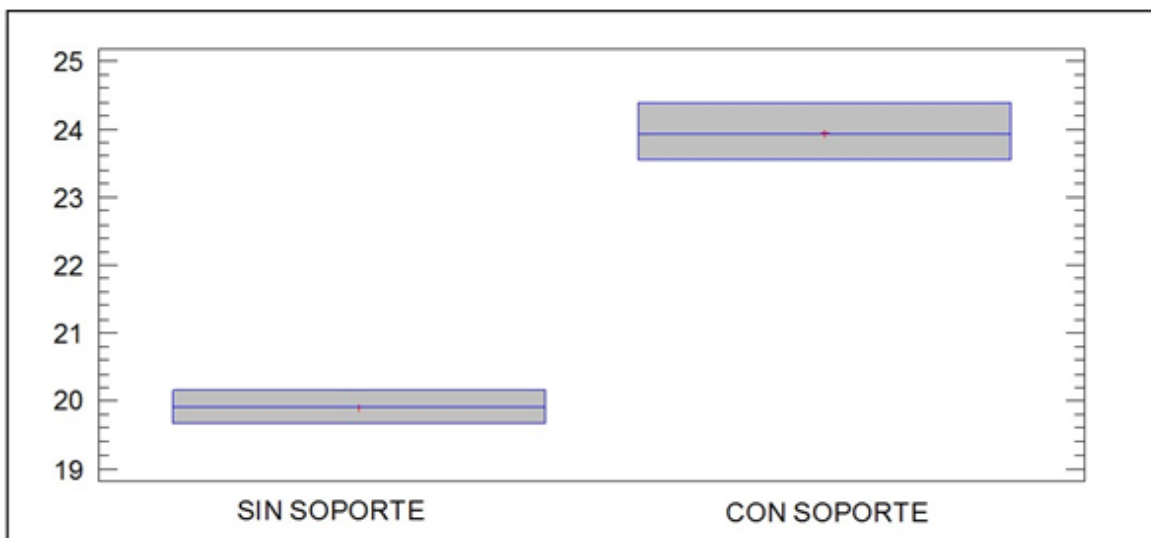


Figura N° 25. Diagrama de caja y bigotes para la producción de Bioetanol 1.5 G en g/L para los reactores sin soporte y con soporte.

El diagrama de caja- bigote presentado en la Figura N° 25 nos proporciona una visión general de la simetría de la distribución de los datos; la línea de color azul ubicada en el centro de la caja representa la mediana. Mediante el estudio de estos diagramas se puede observar la variabilidad de los resultados obtenidos con respecto a la producción de Bioetanol 1.5 G en el sistema de fermentación sin soporte y el sistema de fermentación con soporte. Se observa que los datos obtenidos en la producción de Bioetanol 1.5G para el sistema de fermentación sin soporte poseen valores más próximos entre sí por lo que aparecen más agrupados que los datos obtenidos en la producción de Bioetanol 1.5 G en el sistema de fermentación con soporte en el cual se observa que existe mucha más variabilidad.

b) Determinación de Bioetanol 1.5 G en el Solvente de Extracción

La producción de etanol en el solvente de extracción se evaluó mediante el uso de un potenciostato/galvanostato. (Anexo 7) modelo (Autolab PGSTAT 302N) acoplado a un computador. Para los estudios electroquímicos fue utilizada una celda electroquímica de un compartimiento (Anexo 7).

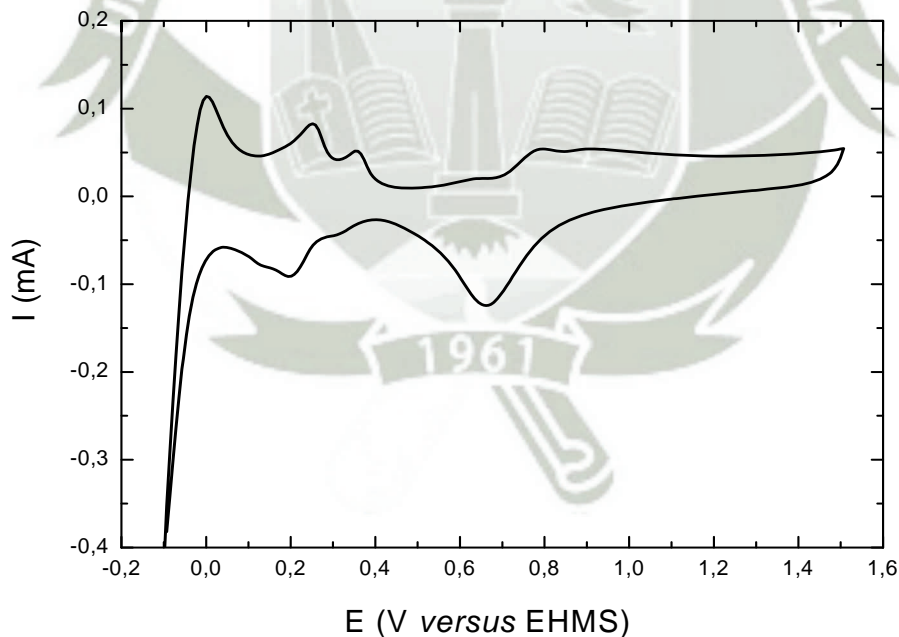


Figura N° 26. Voltamograma cíclico (último ciclo) realizado sobre el electrodo de platina utilizando como solución electrolítica NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) con velocidad de barrido de 100 mV s^{-1}

En las voltametrías, las cuales se muestran en la Figura N° 27, podemos observar la presencia de un pico entre 650 y 750 mV, correspondiente a la oxidación de etanol, por otro lado se observa también un aumento de la corriente de pico cuando la concentración de etanol es incrementada.

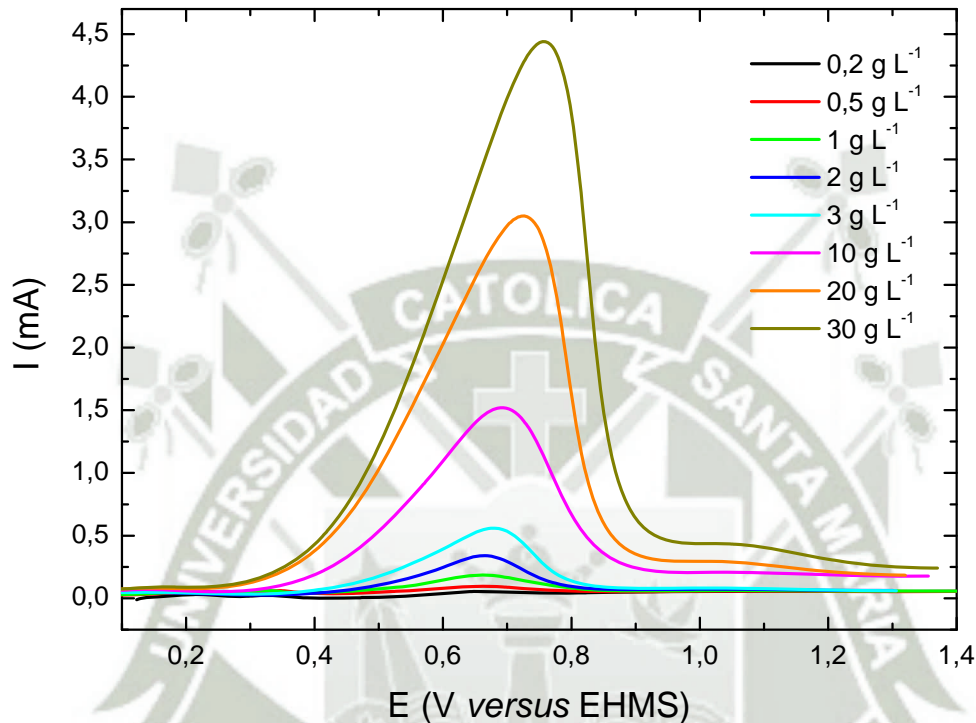


Figura N°27. Voltametrías lineares obtenidas sobre o electrodo de platina, para diferentes concentraciones de Bioetanol 1.5 G.

Así, a partir de estas curvas fue construida la curva analítica de la Figura N°28. Se observa que las corrientes de pico en función de la concentración de etanol siguen una relación bastante lineal, con un R^2 de 0,9997. A partir de esta curva podemos determinar la concentración de etanol para cualquier muestra con concentraciones en el rango usado en este estudio.

Se realizó un sistema de recuperación in situ, para la extracción de Bioetanol 1.5G en los sistemas de fermentación, a fin de extraer el Bioetanol 1.5 G del medio de fermentación, se utilizó como solvente de extracción el aceite de soya. Para determinar la cantidad de

Bioetanol 1.5 G presente en la muestra se utilizó la curva analítica de la variación de la concentración de bioetanol 1.5 G en función de la corriente de pico, mostrada en la Figura N°27.

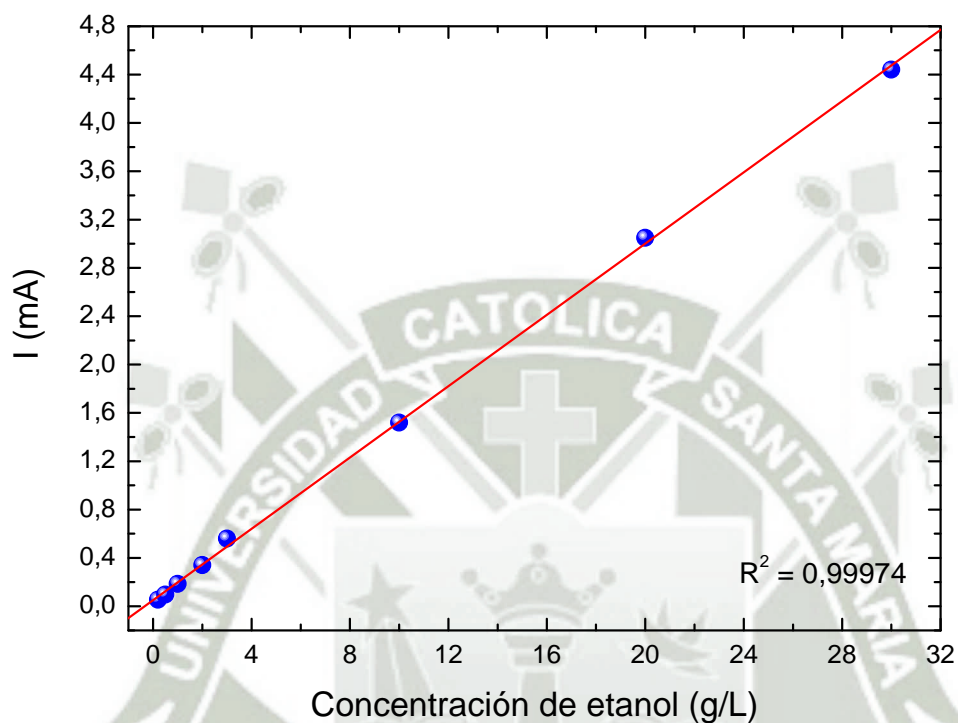


Figura N°28. Curva analítica de la variación de la concentración de Bioetanol en función de la corriente de pico.

En la Figura N° 28 se puede observar la curva de calibración, para la detección de bioetanol 1.5 G en el solvente de extracción, para lo se preparó diferentes soluciones de NaOH (Sigma-Aldrich, P.A. 98%) con concentración de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ las que contenían diferentes concentraciones de etanol (Sigma-Aldrich, 99,5%), desde $0,2 \text{ g L}^{-1}$ hasta 30 g L^{-1} . Con estas soluciones fue construida una curva de calibración, en la cual se obtuvo un R^2 de 0.99974.

Tabla N°30. Valores de concentración de Bioetanol 1.5 G obtenido para las muestras.

Muestra	Concentración de Bioetanol 1.5 G (g/L)
Bioetanol 1.5G en Solvente de Extracción 1	6,2
Bioetanol 1.5G en Solvente de Extracción 2	20,0

La tasa de extracción de bioetanol 1.5G para el sistema de fermentación con soporte fue de 20 g/L y para el sistema de fermentación sin soporte fue de 6,2 g/L. (Tabla N° 30).

Tabla N° 31. Comparación de producción de Bioetanol 1.5 G entre sistema de fermentación con soporte y sistema de fermentación sin soporte.

Sistema	Bioetanol 1.5 G en medio de fermentación (g/L)*	Bioetanol 1.5 G en aceite de soya (g/L)**	Total de Bioetanol 1.5 G en el Sistema (g/L)	Eficiencia (Bioetanol Total/Bioetanol esperado***)%
Sistema sin soporte	19,9102 +/- 0,6032	6,2	26,1102	39,9972%
Sistema con soporte	23,9569 +/- 1,0591	20	43,9569	67,3359%

*Las determinaciones fueron realizadas por triplicado analizadas estadísticamente a un 95,0% de confianza.

**La determinación fue realizada en una sola muestra.

***Etanol teórico: 65,28 g/L⁽¹⁰⁰⁾.

Se detectaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de bioetanol 1.5 G producida al final del proceso de fermentación, para el sistema de fermentación sin soporte se obtiene un promedio de 19,9102 +/- 0,6032 g/L de bioetanol 1.5 G en el medio de fermentación y en el aceite de soya el cual fue utilizado como solvente de extracción se encontró 6,2 g/L de bioetanol 1.5 G; el sistema de fermentación con soporte se obtuvo un promedio de 23,9569 +/-

1,0591 g/L de bioetanol 1.5 G en el medio de fermentación y en el aceite de soya se obtuvo 20 g/L. Los resultados se pueden observar en la Tabla N°31.

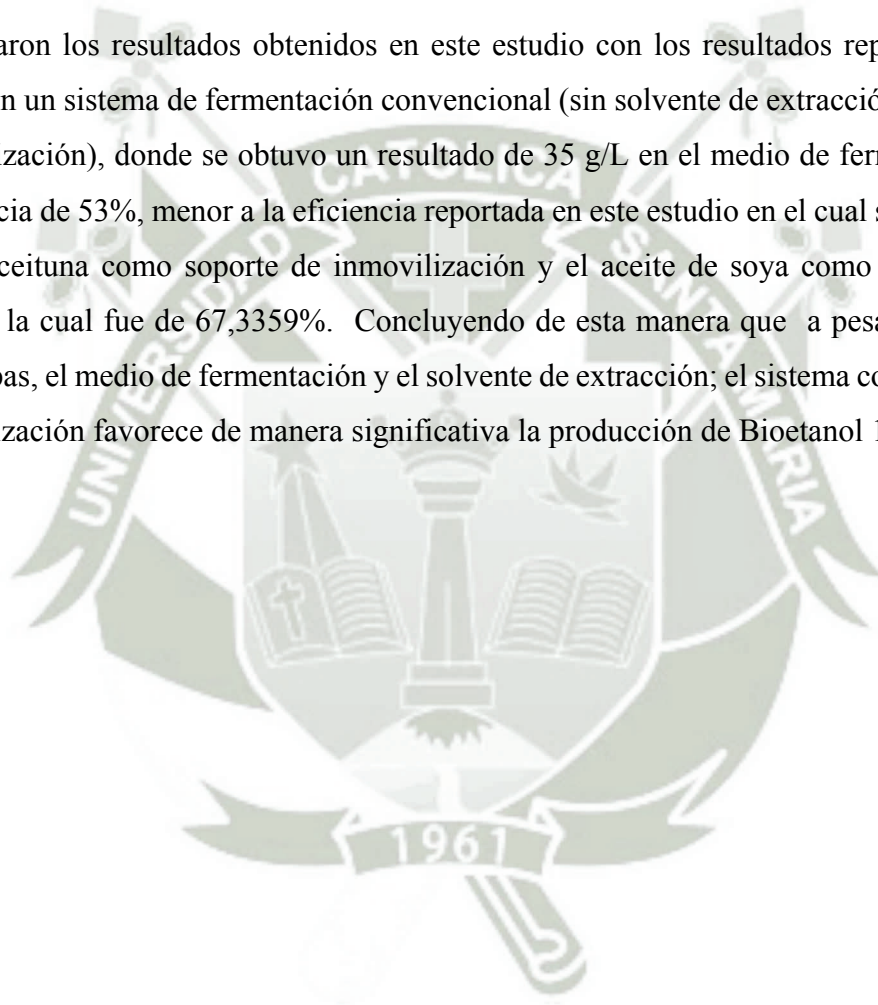
Se utilizó un solvente de extracción en el sistema de fermentación debido a que ayuda a la prolongación del crecimiento de *Kluyveromyces spp.*, debido a la baja tolerancia que tiene la levadura *Kluyveromyces spp* a altas concentraciones de bioetanol, el solvente de extracción permite una mayor producción de bioetanol 1.5 G, el efecto inhibitorio del bioetanol afecta la membrana celular, ocasiona una alteración del flujo de electrones incrementando la permeabilidad. Los resultados obtenidos ilustran los beneficios de la técnica extractiva, se logra una producción mayor de bioetanol en un tiempo similar al proceso convencional. La adición del solvente de fermentación produce la extracción del bioetanol 1.5 G en el medio de fermentación, permitiendo que la levadura siga metabolizando lactosa y produciendo más bioetanol.

Al comparar la producción volumétrica del sistema de fermentación con soporte (43,9569 g/L) y el sistema de fermentación sin soporte (26,1102 g/L) se observó que el uso del soporte de inmovilización reflejó un incremento en la producción de Bioetanol 1.5 G. Este rendimiento es importante y demuestra que el sistema con soporte puede operar eficientemente para convertir una cantidad dada de sustrato, evitando de esta manera la inhibición de la levadura por efecto de la concentración de Bioetanol 1.5 G alcanzada en el medio de fermentación.

Con el sistema de fermentación sin soporte se obtuvo una eficiencia de 39,9972% menor al sistema de fermentación con soporte cuya eficiencia fue de 67,3359%, esto puede deberse a que el uso de microorganismos sin soporte de inmovilización, existe una pérdida casi total de la biomasa, así como la susceptibilidad que pueden tener a factores ambientales como temperatura, pH, entre otros; de igual forma pueden tener menor resistencia a la misma sustancia que se quiera degradar ⁽²⁰⁾. El tipo de inmovilización realizada en este estudio fue una inmovilización pasiva, la cual puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada. El uso de microorganismos inmovilizados permite la operación de biorreactores con agitación constante. La estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos

inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada ⁽⁷¹⁾. Varios estudios han demostrado que el metabolismo de las células inmovilizadas es mucho mayor en comparación al presentado por células libres. El incremento en la actividad metabólica, puede deberse a diferentes factores; Madigan y colaboradores (1997) ⁽¹⁰¹⁾, afirman que gracias al incremento de la biomasa en el soporte, así como la concentración de nutrientes alrededor del soporte, permitirán que se presente este incremento de producto.

Se compararon los resultados obtenidos en este estudio con los resultados reportados por Padín ⁽¹⁰²⁾ en un sistema de fermentación convencional (sin solvente de extracción ni soporte de inmovilización), donde se obtuvo un resultado de 35 g/L en el medio de fermentación y una eficiencia de 53%, menor a la eficiencia reportada en este estudio en el cual se utilizó las pepas de aceituna como soporte de inmovilización y el aceite de soya como solvente de extracción, la cual fue de 67,3359%. Concluyendo de esta manera que a pesar de ser las mismas cepas, el medio de fermentación y el solvente de extracción; el sistema con el soporte de inmovilización favorece de manera significativa la producción de Bioetanol 1.5 G.



CAPITULO V

CONCLUSIONES

PRIMERA.-Se caracterizó fisicoquímicamente la muestra de Kéfir obteniendo una biomasa al final del proceso de fermentación de 11,604 g, pH de 4,37, acidez titulable de 0,774%, humedad de 88,65%, sólidos totales 11,35%, densidad 1,0437g/ml, la muestra de lactosuero fue caracterizada fisicoquímicamente por en el equipo Lactoscan del Laboratorio Veterinario del Sur “LABVETSUR”.

SEGUNDA.-Se aisló seis cepas del género *Kluyveromyces spp.* a partir de una muestra de kéfir, se realizó las pruebas bioquímicas a todas las cepas aisladas, las cuales se identificaron como pertenecientes al género *Kluyveromyces spp.*, debido a que tuvieron las características típicas del género: todas fermentadoras de glucosa, galactosa, lactosa y dos de ellas fermentadoras de maltosa, todas las cepas son productoras de etanol.

TERCERA.-Se evaluó y comparó la producción de bioetanol 1.5 G, consumo de lactosa y producción de biomasa entre las seis cepas denominadas como *L2a*, *L4a*, *L5a*, *L2b*, *G3a* y *G5b*; se obtuvo mayor producción de bioetanol 1.5 G por parte de las cepas *L2a* y *L5a*. Se seleccionaron dos cepas: *L2a* y *L5a* las cuales tuvieron una mayor producción de bioetanol 1.5 G; *L2a* obtuvo un promedio de producción de bioetanol 1.5 G de $25,3707 \pm 0,0337$ g/L y *L5a* un promedio producción de bioetanol 1.5 G de $24,8919 \pm 0,0527$ g/L. Las cepas seleccionadas fueron utilizadas para elaborar los sistemas de fermentación.

CUARTA.-Se validó la metodología de determinación de bioetanol 1,5G en el solvente extractivo utilizando una técnica electroquímica emergente denominada voltametría lineal; se obtuvo una concentración de 6,2 g/L de bioetanol 1.5 G en el aceite de soya utilizado como solvente extractivo en el sistema de fermentación sin soporte y 20 g/L de bioetanol 1.5 G en el aceite de soya utilizado como solvente extractivo en el sistema de fermentación con soporte.

QUINTA.-Se comparó la capacidad de producción de bioetanol 1.5 G, entre los sistemas de fermentación; en el sistema de fermentación sin soporte se obtuvo una producción de $19,9102 \pm 0,6031$ g/L de bioetanol 1.5 G en la fase acuosa y 6,2 g/L de bioetanol 1.5 G en el solvente extractivo, en el sistema de fermentación con soporte se obtuvo $23,9569 \pm 1,0591$ g/L de bioetanol 1.5 G en la fase acuosa y 20 g/L de bioetanol 1.5 G en el solvente extractivo. Se obtuvo una eficiencia de 39,9972% para el sistema de fermentación sin soporte y 67,3359% para el sistema de fermentación con soporte. Concluyendo así que el uso del soporte de inmovilización es determinante en la producción de bioetanol 1.5 G.



RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar estudios con diferentes parámetros como variables, tales como temperatura, pH, tiempo de fermentación, con el fin de determinar las condiciones óptimas para las cepas identificadas en este estudio.
- ✓ Realizar en base a los datos obtenidos en este estudio una optimización del proceso realizado.
- ✓ Determinar la pureza y calidad del bioetanol 1.5 G producido.
- ✓ Realizar una caracterización molecular de las cepas aisladas en este estudio.
- ✓ Determinar otro tipo de aplicaciones para las cepas aisladas, como la producción de otros metabolitos de importancia.
- ✓ Realizar ensayos utilizando diferentes desechos orgánicos como soportes de inmovilización y evaluar su efecto en la producción de bioetanol 1.5 G.

REFERENCIAS

- ¹ Lanchance, MA. (1993). *Kluyveromyces: systematics since 1970*. *Antonie van Leeuwenhoek.*; 63: 95-104.
- ² Gekas V. y M. Lopez-Leiva. (1985) *Hydrolysis of lactose: A literature review*. *Process Biochem.*; 22: 2-12.
- ³ Malajovich, M.A. (2010) *Biotecnología o impacto na sociedade*, Instituto de Tecnologia ORT do Rio de Janeiro.
- ⁴ Guimarães, P.M.R.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. (2010) *Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey*. *Biotechnology Advances*. 28: 375–384.
- ⁵ Rocha, S.N. (2010) *Expressão e Secreção de proteínas heterólogas em leveduras do gênero Kluyveromyces*. Tese de doutorado do Programa de Engenharia Química da Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- ⁶ Kreger-van Rij, N. (1984). *The yeasts a taxonomic study*. ed. Elsevier. Amsterdam. Pp.233-238.
- ⁷ Lane, M.M.; Morrissey, J.P. (2010). *Review Kluyveromyces marxianus: A yeast emerging from its sister's shadow*. *Fungal Biology Reviews* 24: 17-26.
- ⁸ Mahoney R. (1998). *Oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review*. *Food Chemistry*. 63: 147-154.
- ⁹ Santos A., M. Ladero y F. García-Ochoa. (1998). *Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from Kluyveromices fragilis*. *Enzyme and Microbial Technol*. 22: 558-567.
- ¹⁰ Silveira, R.F. (2006) *Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo*. Dissertação de mestrado do Programa de Pósgraduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- ¹¹ Banat, I.M.; Marchant, R. (1995) *Characterization and potential industrial applications of Five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains*. *World J. Microbiol Biotechnol* 11: 304-306.
- ¹² Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). *Chemical and microbiological characterisation of kefir grains*. *Journal of Dairy Research*, 68(4):639-652.
- ¹³ Romero S. R, Mestres J. (2004) *Productos Lácteos Tecnología* [Libro en línea]. Edición UPC.
- ¹⁴ Farnworth Edward R. (2008) *Handbook of Fermented Functional Foods*. 2a Edición. Taylor and Francis Group, LLC. Estados Unidos. Capitulo 4.

- ¹⁵ Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. (2006) Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*. Pp. 67-74; Disponible en: http://kefir.it/symbiotic_yeasts.pdf [Acceso 23 de noviembre 2013]
- ¹⁶ Koroleva, N. S. (1991). Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K., editor. *Therapeutic properties of fermented milks*. Elsevier Applied Sciences Publishers, London, UK. Pp.159-179
- ¹⁷ Latorre-García, L., Del Castillo-Agudo, L., & Polaina, J. (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6): 785-791.
- ¹⁸ Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2000). Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63(3): 364-369.
- ¹⁹ Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallavalle, P., & Parisi, M. G. (1994). Kefir: *Microbiologia, Chimica e Tecnologia*. *Industria del Latte*, 30(1): 41-62.
- ²⁰ Kourkoutas, Y., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Banat, I. M., & Marchant, R. (2002). Continuous whey fermentation using kefir yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9): 2543-2547.
- ²¹ Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Psarianos, C., Kanellaki, M., Agouridis, N., et al. (2007). Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5):576-582.
- ²² El cultivo de kéfir de Leche. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/43388271/0-EI-CULTIVO-de-KEFIR-de-LECHE-Articulo-Completo-Mejoras-Beneficios-Tratamientos>. [Acceso el 22 de febrero de 2013]
- ²³ Composition of kefir. Disponible en: <http://www.kefir.co.kr/eng/kefiran.php>. [Acceso el 03 de marzo de 2013].
- ²⁴ Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T, Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2011). Review: Functional properties of kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3):261-268.
- ²⁵ Luquet, F.M. (1993). *Leche y productos lácteos, vaca, oveja y cabra*, Editorial Acribia, Zaragoza España. Pp 287-294.
- ²⁶ López, M. (2004). *Biotechnology alimentaria*. Distrito Federal: Limusa. Pp.197

- ²⁷ Londoño, M., J. Sepúlveda, A. Hernández y J. Parra. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con lactobacillus casei. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 61(1): 4409-4421.
- ²⁸ Baldasso, C.; Barros, T.; Tessaro, I. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278: 381 - 386.
- ²⁹ Recinos Rivas, Lissete Aracely & Saz Guerrero, Oscar Alejandro (2006). Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en El Salvador (Trabajo de graduación), Universidad del Salvador, San Salvador, El Salvador.
- ³⁰ Camean, A.; Repetto, M. (2012). *Toxicología alimentaria*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A. Pp.588.
- ³¹ Alais, C. (2003). *Ciencia de la Leche: Principios de Técnica Lechera*. Barcelona: Reverté, S.A. Pp. 191.
- ³² Wit, J. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*. 81 (3): 597 – 608.
- ³³ Adam AC, Rubio-Teixeira M, Polaina J. (2004). Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44:553–7.
- ³⁴ GanzleMG, HaaseG, Jelen P. (2008). Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int Dairy J*. 18:685–94.
- ³⁵ Zadow, J.G. (1984). Lactose Properties and uses. Symposium: “Production and utilization of whey components”. *J. Dairy Sci*. 67: 2654-2679
- ³⁶ Akre, J. (1994). *Alimentação Infantil – Bases Fisiológicas*. Organização Mundial de Saúde de Genebra,. Disponible en: <<http://www.ibfan.org.br/documentos/ibfan/doc-288.pdf>>. [Acceso el 03 de marzo de 2013].
- ³⁷ Guimarães, P.M.R.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. (2008). Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 30: 1953–1958.
- ³⁸ Office of Premarket Approval. (1998). Partial list of enzyme preparations that are used in foods. Center for Food Safety & Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. Rockville, Estados Unidos de América.
- ³⁹ ExPASy. (1999). ProtParam tool. Swiss Institute of Bioinformatics. Genève 4, Suiza.

- ⁴⁰ Mahoney R. y J. Whitaker. (1978). Purification and physiochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Science*. 43: 584-591.
- ⁴¹ Veisseyre, D. (1988) .Lactología técnica, composición, recogida y transformación de la leche. Acribia, S.A. España. Pp. 573-576.
- ⁴² Madrid, V. A. (1994). Nuevo Manual de Tecnología Quesera. AMV Ediciones. Madrid España. Pp.209-221
- ⁴³ Amiot J. (1994). Ciencia y Tecnología de la Leche. R, Ed. Acribia, S.A.Zaragoza, España. Pp.376-377
- ⁴⁴ Mawson A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technol*, 47: 195-203.
- ⁴⁵ Spreer, R.E. (1991). Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater Treatment, *Environmental Science and Technology*. 17(9).
- ⁴⁶ González, S., A. (1996). The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: a review. *Bioresource Technology*. 57: 1-11.
- ⁴⁷ Aider, M., Halleux, D: and Melnikova, I. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(3): 334-341.
- ⁴⁸ Almécija, M.C. (2007). Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España.
- ⁴⁹ Revillion, J.P., A. Brandelli and M. Ayub. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology* 46(1): 121-127.
- ⁵⁰ Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en nutrición humana. Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia* 16: 11-20.
- ⁵¹ Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105: 1-14.
- ⁵² Rogosa M, Browne HH, Whittier EO. (1947). Ethyl alcohol from whey. *J Dairy Sci*. 30: 263–9.
- ⁵³ Fukuhara H. (2006). *Kluyveromyces lactis*—a retrospective. *FEMS Yeast Res*. 6:323–4.

- ⁵⁴ Mawson A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technol*, 47: 195-203.
- ⁵⁵ Verduyn C, Postma E, Sheffers WA, van Dijken JP. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 8: 501-517.
- ⁵⁶ Kocková-Kratochvilová A. (1990). *Yeast and yeast-like organisms*. Ed. VCH, New York.
- ⁵⁷ Gancedo C. y R. Serrano (1989). Energy-yielding metabolism. En *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts*. A.H. Rose y J.S. Harrison (eds.). Ed. Academic Press, London. 3(2): 205-260
- ⁵⁸ Hohmann S. (1997). Pyruvate decarboxylases. En *Yeast sugar metabolism*. Ed. Technomic. Lancaster. Pp. 187-212.
- ⁵⁹ Gancedo C. y R. Serrano (1989). Energy-yielding metabolism. En *The yeast. Metabolism and physiology of yeasts*. Ed. Academic Press, London. 3(2): 205-260.
- ⁶⁰ Rubio-Teixeira, M.A. (2005). Comparative analysis of the GAL genetic switch between not so distant cousins-*Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*.5: 1115-1128.
- ⁶¹ Hatzinikolau D., Wang H. (1992). "Extractive Fermentation Systems for Organic Acid Production". *Can. J. Chem. Eng.*70:543-552.
- ⁶² Maiorella B.L., Blanch H.W., Wilke C.R. (1984). "Biotechnology Report – Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes", *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1003-1025.
- ⁶³ Geankoplis C. (2003). *Transport Processes and Separation Process Principles (includes unit operations)*. NJ, USA: Prentice Hall Press Upper Saddle River.
- ⁶⁴ Jassal DS, Zhang, Hill GA. (1994). In situ extraction and purification of ethanol using commercial oleic acid. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 72:822-827.
- ⁶⁵ Koullas DP, Umealu OS, Koukios EG. (1999). Solvent selection for the extraction of ethanol from aqueous solutions. *Separation Science and Technology* 34: 2153-2163.
- ⁶⁶ Kollerup, Finn., Daugulis, Andrew. (1986). Ethanol Production by Extractive Fermentation – Solvent Identification and Prototype Development. *Can. J. Chem. Eng.* 64: 598-606.

- ⁶⁷ Offeman RD, Stephenson S. K, Robertson GH, Orts WJ. (2005). Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions 1. Screening methodology for solvent. *Industrial Engineering and Chemistry Research*. 44: 6789-6796.
- ⁶⁸ Rahman MA, Rahman MS, Asadullah M. (1995) . Production of fuel grade ethanol from dilute solution by liquid-liquid extraction using vegetable oils as solvents. *Indian Journal of Chemical Technology*. 2:90-92.
- ⁶⁹ Simonne, A. H.; Smith, M.; Weaver, D. B.; Vail, T.; Barnes, S.; Wei, C.I. (2000). Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame), during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:6061-6069.
- ⁷⁰ Embrapa Soja. *Tecnología de Produção de Soja – Paraná 2007*. Londrina, PR, (2006). Disponible en: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/parana2007>>. [Acceso el 22 de febrero de 2013].
- ⁷¹ O'reilly, K., Crawford, R. (1989). Kinetics of p-Cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(4): 866-870.
- ⁷² Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1997), Brock, *Biology of Microorganisms*, eighth ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- ⁷³ Cohen, Y. (2001). Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*. 77: 257-274
- ⁷⁴ OPET (2002). European Network Commission, Programa de trabajo N° 6 OPET RUE - Biomasa, sobre Potencial y aprovechamiento energético de la biomasa del olivar, dentro de las líneas de actuación de OPET SUR ESPAÑA (Contrato NNE5-199-0791).
- ⁷⁵ Chandel AK, Chan ES, Rudravaram R, Narasu ML, Rao LV, Ravindra P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2: 14-32
- ⁷⁶ Wyman CE. (1996). *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Washington: Taylor and Francis. Pp. 424
- ⁷⁷ Shakhshiri. (2006). Ethanol. Chemical of the week. Disponible en: <http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/PDF/Ethanol.pdf>. [Acceso: 12-11-2013]

- ⁷⁸ Goršek A, Tramšek M. (2007). Quantitative Examination of Process Parameters during Kefir Grain Biomass Production. International Journal of Chemical Reactor Engineering Disponible en: http://www.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?context=ijcre&article=1409&date=&mt=MTMxMzQ0MDE1Nw==&access_ok_form=Continue[Acceso el 26 de marzo de 2013]
- ⁷⁹ Horwitz W. (2000) .Editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. ed. USA: AOAC International. 2(17).
- ⁸⁰ Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones físicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Diario Oficial de la Federación (12/09/2003). Disponible en: http://www.cedna.oaxaca.gob.mx/pdf/normatividad/Reglas_div/rd8.pdf. [Acceso el 15 de mayo de 2013].
- ⁸¹ Marshall, R. T. (ed.). (1993). Standard methods for the microbiological examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- ⁸² Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow. (1990) . Yeast characteristics and identification, sec.edn., Cambridge: Cambridge University Press.
- ⁸³ Varga- Erdei E. (2011). Improvement of *Kluyveromyces marxianus* yeast strains for bioethanol production. University of Debrecen.
- ⁸⁴ Goñi Solano Cristina. (2006). Microbiología General.Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales. UPNA/CSIC
- ⁸⁵ Nahvi I. and Moeini H. Isolation and Identification of Yeast Strains with High Beta-galactosidase Activity from Dairy Products. Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, IR Iran.
- ⁸⁶ Vanegas M, Zapata Pineda. Aislamiento de Levaduras capaces de producir alcohol a partir de macrofitas acuáticas extraídas mecánicamente de la laguna de Fúquene.Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, carrera de Microbiología industrial. Bogotá D.C.
- ⁸⁷ Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956). Colorimetric determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- ⁸⁸ Montiel X, Carruyo I, Ferrer J, Marcano L, Marmol Z, Paez G. (2000). Producción de β -D galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga, con lactosuero como sustrato. Rev Tec Ing Univ Zulia. 23:134-40.
- ⁸⁹ Araujo K, Páez G, Mármol Z, Ferrer J, Ramones E, Aiello C, Rincón M. (2007) Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de β -D-galactosidasa (EC. 3.2.1.23). departamento de Ingeniería

Bioquímica. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de Zulia, Venezuela. 30:64-73.

⁹⁰ Quintero H, Rodríguez M, Páez G, Mármol Z, Rincón M. (2001). Producción continua de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir del suero de leche. *Revista Científica FCVLUZ*. 9:87-94.

⁹¹ Curso Balance de Materia y Energía. Curricula 2014. Programa Profesional Ingeniería Biotecnológica. Universidad Católica de Santa María.

⁹² Joshi Y., Senatore B., Poletto M. *Kluyveromyces Marxianus* Biofilm in Cheese Whey Fermentation for Bioethanol Production. Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare, University of Salerno, and Prodal, Scarl.

⁹³ Norma del Codex para leches fermentadas CODEX STAN 243-2003. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXS_243s.pdf. [Acceso el 15 de mayo de 2013].

⁹⁴ Leches fermentadas especificaciones. Especificación Técnica Cubana. Oficina Nacional de Normalización NC-TS 457:2007. Disponible en: <http://www.ica.edu.cu/Normas/Alimentos/Leche/NC%20TS%20457.%20Leches%20fermentadas.%20Especific.pdf>. [Acceso el 22 de febrero de 2013].

⁹⁵ Morrison, R. y Boyd, R. (1998). Química orgánica. Quinta Edición. New York University. Pearson Education. Pp.1450.

⁹⁶ Kurtzman, C. Robnett, C. (1991). Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*. 7: 61-72.

⁹⁷ Kurtzman, J.W. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Fell, Teun Boekhout Elsevier. 1:2354.

⁹⁸ Estequiometría del Crecimiento y Formación del Producto. Disponible en: <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201010/Estequiometria.pdf> [Acceso el 12 de noviembre de 2014]

⁹⁹ Gemeiner, P., Rexova, L., Svec, F., Norrlov, O. (1994), Natural and synthetic carriers suitable for immobilization of viable cells, active organelles and molecules. *Bioresource Technology*. 77 : 257-274.

¹⁰⁰ Walter G. (1990) Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* NRRLy2415 during fermentation of lactose. *J Chen Biotechnol*.49: 75-89..

¹⁰¹ Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1997), Brock, *Biology of Microorganisms*, eighth ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

¹⁰² Padín, C, Díaz M., (2009), Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.-Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 29:110-116



ANEXOS

ANEXO 1: CÁLCULOS

Este anexo presenta los diferentes cálculos realizados para obtener los datos de los parámetros fisicoquímicos del kéfir.

✓ **Acidez Titulable**

$$\% \text{ Acidez Total} = \frac{\text{mL NaOH} \times N \times 0,09}{\text{g de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Acidez Total} = \frac{8,6\text{mL NaOH} \times 0,1 N \times 0,09}{10\text{g de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Acidez Total} = 0,774$$

✓ **Humedad**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{46,160 - 44,387}{46,160 - 44,160} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = 88,65$$

Donde:

m1 = Peso del envase vacío, en gramos.

m2 = Peso del envase con la muestra antes del secado, en gramos.

m3 = Peso del envase con la muestra desecada, en gramos.

✓ **Sólidos totales**

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100\% - \text{Humedad}$$

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100\% - 88,65\%$$

$$\% \text{ Sólidos totales} = 11,35\%$$

✓ **Determinación de Densidad.**

La densidad fue determinada con la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)}$$

$$\rho = \frac{(92,36 - 38,33)}{(90,10 - 38,33)}$$

$$\rho = 1,0437\text{g/m}$$

ANEXO 2. DATOS CURVA DE CALIBRACIÓN LACTOSA

Tabla N°32. Curva de calibración para lactosa en g/L

[Lactosa] g/L	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0	0	0	0
0.02	0,153	0,145	0,139
0.04	0,272	0,277	0,254
0.06	0,386	0,374	0,368
0.08	0,522	0,431	0,496
0.1	0,612	0,524	0,608
0	0	0	0

Donde Abs: Absorbancia

ANEXO 3. DATOS CURVA DE CALIBRACIÓN BIOETANOL 1.5G

Tabla N°33. Curva de calibración para Bioetanol 1,5 G en g/L

[Etanol] g/L	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0	0	0	0
10	0,084	0,095	0,092
20	0,179	0,193	0,185
40	0,343	0,342	0,343
50	0,424	0,426	0,435
60	0,498	0,523	0,511
70	0,575	0,586	0,578

Donde Abs: Absorbancia

ANEXO 4. EVALUACIÓN DE LAS SEIS CEPAS AISLADAS DE KÉFIR

Tabla N°34. Concentración de la producción de etanol en g/L para seis cepas seleccionadas

t (h)	L2a		L4a		L5a		L2b		G3a		G5b	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,486	0,491	0,364	0,359	0,243	0,237	0,121	0,117	0,728	0,704	0,850	0,842
2	1,942	1,936	1,335	1,328	0,728	0,700	0,607	0,598	1,457	1,448	1,335	1,329
3	5,706	5,698	2,792	2,803	1,335	1,342	3,521	3,517	2,064	2,071	3,521	3,512
4	8,984	8,987	3,642	3,647	1,821	1,798	5,827	5,831	4,735	4,742	8,741	8,736
5	9,712	9,709	6,070	6,103	9,834	9,827	8,013	8,103	5,463	5,469	9,105	9,089
6	10,319	10,297	9,227	9,233	10,076	10,015	9,834	9,847	9,834	9,842	10,805	10,792
7	14,447	14,428	10,076	10,092	11,655	11,657	15,661	15,684	11,898	11,912	15,540	15,528
8	16,996	17,016	14,447	14,442	17,968	17,975	17,239	17,234	16,511	16,515	17,603	17,596
9	18,575	18,596	15,782	15,793	22,945	22,953	17,603	17,596	17,846	17,852	18,939	18,934
10	23,795	23,802	16,147	16,150	23,674	23,680	18,696	18,702	18,575	18,597	19,303	19,300
11	24,523	24,528	21,853	21,860	24,281	24,294	19,060	18,997	18,818	18,796	19,789	19,792
12	25,131	25,138	22,581	22,604	24,766	24,759	20,032	20,036	19,546	19,539	19,910	19,938
13	25,373	25,368	22,945	22,973	24,888	24,796	20,639	20,643	19,789	19,783	20,396	20,407

Donde R1 y R2 = Concentraciones de etanol en g/L , indican el número de repetición

Tabla N°35. Resumen de producción de etanol en g/L para seis cepas seleccionadas

t (h)	Cepas					
	L2a	L4a	L5a	L2b	G3a	G5b
0	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0	0+/-0
1	0,4885+/-0,0317	0,3615+/-0,0317	0,2400+/-0,0381	0,1190+/-0,0254	0,7160+/-0,1524	0,8460+/-0,0508
2	1,9390+/-0,0381	1,3315+/-0,0444	0,7140+/-0,1778	0,6025+/-0,0571	1,4525+/-0,0571	1,3320+/-0,0381
3	5,7020+/-0,0508	2,7975+/-0,0698	1,3385+/-0,0444	3,5190+/-0,0254	2,0675+/-0,0444	3,5165+/-0,0571
4	8,9855+/-0,0190	3,6445+/-0,0317	1,8095+/-0,1461	5,8290+/-0,0254	4,7385+/-0,0444	8,7385+/-0,0317
5	9,7105+/-0,0190	6,0865+/-0,2096	9,8305+/-0,0444	8,0580+/-0,5717	5,4660+/-0,0381	9,0970+/-0,1016
6	10,3080+/-0,1398	9,2300+/-0,0381	10,0455+/-0,3875	9,8405+/-0,0825	9,8380+/-0,0508	10,7985+/-0,0826
7	14,4375+/-0,1206	10,0840+/-0,1016	11,6560+/-0,0126	15,6725+/-0,1461	11,9050+/-0,0888	15,534+/-0,0762
8	17,0060+/-0,1270	14,4445+/-0,0318	17,9715+/-0,0444	17,2365+/-0,0318	16,5130+/-0,0253	17,5995+/-0,0444
9	18,5855+/-0,1334	15,7875+/-0,0699	22,9490+/-0,0508	17,5995+/-0,0444	17,8490+/-0,0381	18,9365+/-0,0318
10	23,7985+/-0,0444	16,1485+/-0,0190	23,6770+/-0,0381	18,6990+/-0,0381	18,5860+/-0,1397	19,3015+/-0,0190
11	24,5255+/-0,0318	21,8565+/-0,0444	24,2875+/-0,0826	19,0285+/-0,4002	18,8070+/-0,1397	19,7905+/-0,0190
12	25,1345+/-0,0444	22,5925+/-0,1461	24,7625+/-0,0444	20,0340+/-0,0253	19,5425+/-0,0444	19,9240+/-0,1779
13	25,3705+/-0,0318	22,959+/-0,1779	24,8420+/-0,5845	20,6410+/-0,0253	19,7860+/-0,0381	20,4015+/-0,0698

Donde t= tiempo. –Fuente : Statgraphics Centurion XIV

Tabla N°36. Resumen de consumo de lactosa en g/L para seis cepas seleccionadas

t (h)	L2a	L4a	L5a	L2b	G3a	G5b
0	28,2+/-0,0000	28,2+/-0,0000	28,2+/-0,0000	28,2+/-0,0000	28,2+/-0,0000	28,2+/-0,0000
1	26,9623+/-2,0606	27,3237+/-1,3124	26,9800+/-2,3795	27,5900+/-1,6113	26,8467+/-1,7737	26,9623+/-2,0606
2	25,8883+/-1,2685	26,1137+/-1,297	25,8353+/-2,344	26,5160+/-1,4279	26,1147+/-2,0557	25,8883+/-1,2685
3	23,4077+/-1,5403	24,0770+/-1,2784	25,5193+/-1,2296	25,0860+/-1,7349	24,0693+/-1,6590	23,4077+/-1,5403
4	22,0113+/-1,5853	23,5097+/-1,6978	23,2593+/-3,4098	22,7677+/-1,1154	23,1097+/-2,0319	22,0113+/-1,5853
5	20,8117+/-1,8643	21,7283+/-1,4267	19,3033+/-2,6692	20,9267+/-1,9747	21,9357+/-2,0835	20,8117+/-1,8643
6	18,0713+/-2,4313	19,2570+/-2,5892	16,9727+/-1,2521	19,6383+/-1,8553	20,3387+/-1,6663	18,0713+/-2,4313
7	15,5053+/-1,1776	18,0033+/-2,2876	15,1813+/-4,4230	15,2280+/-2,0085	17,7550+/-2,4712	15,5053+/-1,1776
8	12,6003+/-1,3678	15,9477+/-1,9464	11,7493+/-0,2599	11,9477+/-2,1529	14,3307+/-2,7651	12,6003+/-1,3678
9	11,1997+/-1,3649	12,0030+/-1,6692	9,0230+/-1,9155	11,3770+/-1,3018	12,0627+/-2,4200	11,1997+/-1,3649
10	8,5397+/-1,0768	10,7813+/-1,6336	8,0273+/-0,2142	10,3207+/-1,5547	10,3013+/-1,1804	8,5397+/-1,0768
11	7,7210+/-1,4234	8,78667+/-1,6314	7,3073+/-1,1150	9,05833+/-0,9277	9,7273+/-1,1569	7,7210+/-1,4234
12	6,2356+/-1,2848	7,6770+/-0,6144	6,6753+/-1,4165	8,2430+/-0,9478	8,7477+/-1,1708	6,2356+/-1,2848
13	5,8780+/-0,6810	6,9183+/-2,1226	6,1743+/-0,4469	7,7590+/-0,7535	7,6710+/-0,8939	5,8780+/-0,6810

Donde t= tiempo. –Fuente : Statgraphics Centurion XIV

Tabla N°37. Resumen de incremento de biomasa en g/L para seis cepas seleccionadas

t (h)	L2a	L4a	L5a	L2b	G3a	G5b
0	0,1905	1,0238	0,3810	0,6667	0,4762	0,5952
1	0,2381	0,5238	1,1905	1,1667	0,8333	1,0238
2	0,6190	1,4762	1,3571	0,5952	0,9286	4,1429
3	1,2381	2,1190	1,9048	1,4286	1,7619	4,5952
4	1,3810	2,2619	2,2381	1,3333	2,1905	5,9524
5	1,1667	4,1905	3,9762	5,3571	4,5238	3,8095
6	1,5714	4,6190	4,5238	3,6190	4,2143	3,3333
7	2,1190	4,4524	4,4048	3,3810	4,2857	3,1429
8	2,6667	4,2619	4,1429	2,3333	4,2619	2,8333
9	2,5714	4,2143	2,0714	2,3095	3,8095	2,9286
10	2,1667	4,2857	1,9048	0,9762	3,6667	3,0238
11	1,5476	3,8095	1,8333	0,7381	3,1667	2,8333
12	1,2667	3,2857	1,4762	0,5000	3,0714	2,8571
13	0,6905	3,0476	1,3810	0,2619	0,6667	2,0238

Donde t= tiempo. –Fuente : Statgraphics Centurion XIV

ANEXO 5: HOJA DE CÁLCULO DE BALANCE ESTEQUIOMÉTRICO

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23																				
24																				

Figura N°29. Hoja de Microsoft Excel con macros en visual basic con balance estequiométrico (Estequiometria Microbiana xlsx. en Microsoft Excel 2007)

ANEXO 6: DATOS OBTENIDOS EN SISTEMAS SIN SOPORTE Y CON SOPORTE

Tabla N°38. Producción de Bioetanol 1.5 G en g/L en reactores Batch sin y con soporte de inmovilización.

Horas	Sin soporte	Con soporte
0	0	0
8	12,7878+/-1,9622	17,1179+/-0,9047
9	14,0423+/-0,6278	18,0891+/-1,3146
10	14,3256+/-0,9047	18,7366+/-0,9213
11	14,9731+/-1,1418	19,1008+/-0,759
12	15,8634+/-0,4607	20,153+/-1,3145
13	16,4299+/-0,9694	21,0837+/-0,7589
14	17,3202+/-0,7589	21,6907+/-1,3599
15	17,6035+/-0,7979	22,4192+/-0,6278
16	18,4938+/-1,1418	23,269+/-0,9213
18	19,3436+/-0,6965	23,6332+/-0,6277
20	19,9102+/-0,6031	23,9569+/-1,0591

Tabla N°39. Concentración de la producción de Bioetanol 1,5 G en g/L para seis cepas seleccionadas

horas	SIN SOPORTE			CON SOPORTE		
	Concentración 1 g/L	Concentración 2 g/L	Concentración 3 g/L	Concentración 1 g/L	Concentración 2 g/L	Concentración 3 g/L
0	0	0	0	0	0	0
8	13,5972	12,0189	12,7474	17,4821	16,7537	17,1179
9	14,3256	13,8400	13,9614	18,3319	17,4821	18,4533
10	14,6898	13,9614	14,3256	18,8175	18,3319	19,0603
11	15,1754	14,4470	15,2968	19,0603	18,8175	19,4245
12	16,0253	15,6610	15,9038	19,7888	19,9102	20,7600
13	16,8751	16,1467	16,2681	21,3670	20,7600	21,1242
14	17,3607	16,9965	17,6035	22,2168	21,1242	21,7312
15	17,8463	17,2393	17,7249	22,7024	22,3382	22,2168
16	18,6961	17,9677	18,8175	23,6737	22,9452	23,1881
18	19,6674	19,1817	19,1817	23,9165	23,4309	23,5523
20	19,9102	19,6674	20,1530	24,4021	23,5523	23,9165

ANEXO 7: GALERÍA DE FOTOS



Figura N°30. Fotografía de reactor Batch utilizado en la producción de Bioetanol 1.5G, constituido por (1) Agitación, (2) Válvula de alivio de presión, (3) Manómetro, (4) Control de temperatura, (5) Entrada de agua, (6) Salida de agua.



Figura N° 31. Equipo utilizado para la detección de etanol en el solvente de extracción.

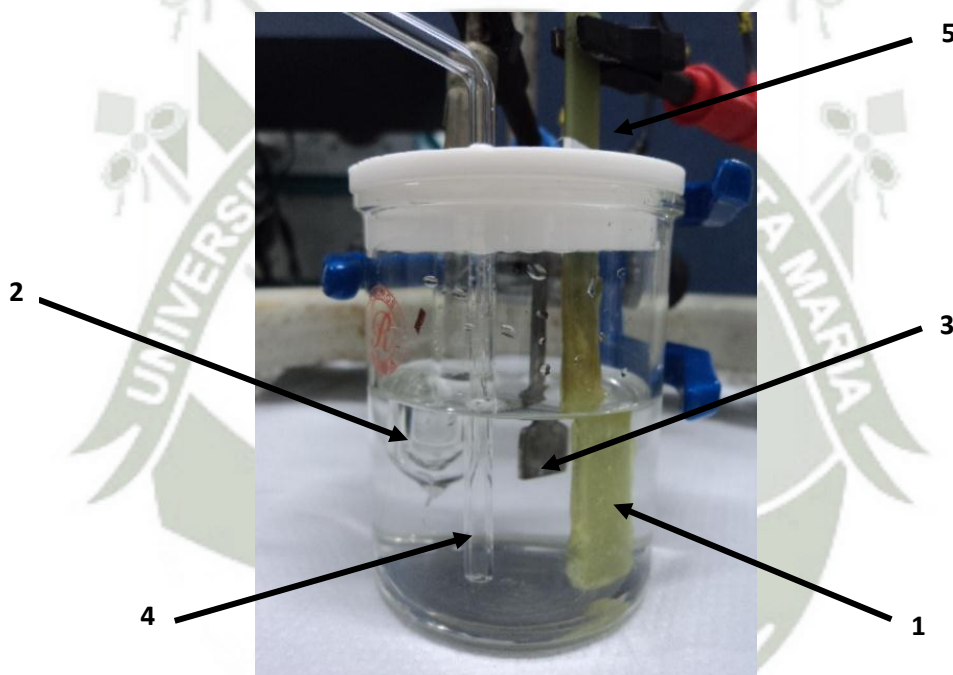


Figura N° 32. Fotografía de la celda electroquímica de un compartimiento, siendo constituida por: (1) electrodo de trabajo, (2) electrodo de referencia, (3) contra electrodo, (4) entrada de nitrógeno y (5) salida de gases.

ANEXO N°8: CERTIFICACIÓN

Este anexo presenta los certificados proporcionados por el Laboratorio Veterinario del Sur (LABVETSUR) consultado para la caracterización fisicoquímica del lactosuero.



INFORME DE ENSAYO

DE CONTROL DE CALIDAD FISICOQUIMICO DE LACTOSUERO

I SISTEMA DE MUESTREO EMPLEADO:

Muestreo realizado por el solicitante.

II. DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre Srta. Alexandra Daniela Barrios Eguiluz
Dirección Urb. Independencia Americana A 1 Umacollo

III. DATOS DEL SERVICIO

No. De diag 332
Referencia de LVS C9/5
Fecha de envío 23/5/2013
Servicio solicitado Examen Fisicoquímico

IV. DATOS DE LA MUESTRA

Nombre de la muestra Lactosuero
Presentación En envase de vidrio
Fecha de recolección 23/5/2013
Lugar de recolección No indica

V. ASPECTOS TECNICOS DEL MUESTREO

Muestreado por La interesada
Fecha del muestreo 23/5/2013
Condición de la muestra Aparentemente en buenas condiciones
No. De unidades de muestra Dos (02)

VI. PROPÓSITO DEL ENSAYO

Control de calidad solicitado por el interesado.

VII. ESPECIFICACION TECNICA:

No aplica



MVZ. Mg. JORGE MANRIQUE MEZA
CMVP - 809
GERENTE

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A
Teléfonos: 054-213677 - 232175
e-mail: labvetsur@hotmail.com
Arequipa - Perú



VIII. RESULTADOS

	M1 Lactosuero 23/5/2013
pH	4,8
Mat. Grasa g/100	0,57
Densidad g/cc a 15°C	1,022
Sólidos no grasos g/100 (%)	5,80
Sólidos totales g/100 (%)	6,37
Proteínas g/100 (%)	2,15

IX. METODOS DE ENSAYO EMPLEADOS

Determinación de pH, materia grasa, densidad, lactosa, sólidos no grasos, sólidos totales y proteínas el Método de Ultrasonido. Lactoscan.

Nota: Los resultados sólo se refieren a las muestras recepcionadas en el laboratorio.

Arequipa, 23 de Mayo del 2013



Q.F. Claudia C. de la Cruz
C.I. 10433

es calidad



**INFORME DE ENSAYO
DE CONTROL DE CALIDAD FISICOQUIMICO DE SUERO DE LECHE**

I SISTEMA DE MUESTREO EMPLEADO:

Muestreo realizado por el solicitante.

II. DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre Srta. Katherine Quispe Maribal
Dirección Urb. Piedra Santa V-11

III. DATOS DEL SERVICIO

No. De diag 578
Referencia de LVS C12/8
Fecha de envío 29/8/2013
Servicio solicitado Examen Físicoquímico

IV. DATOS DE LA MUESTRA

Nombre de la muestra Suero de Leche
Presentación En envase de vidrio
Fecha de recolección 29/8/2013
Lugar de recolección No indica

V. ASPECTOS TECNICOS DEL MUESTREO

Muestreado por La interesada
Fecha del muestreo 29/8/2013
Condición de la muestra Aparentemente en buenas condiciones
No. De unidades de muestra Una (01)

VI. PROPÓSITO DEL ENSAYO

Control de Calidad según solicitud del interesado

VII. ESPECIFICACION TECNICA:

No aplica

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A
Teléfonos: 054-213677 - 232175
e-mail: labvetsur@hotmail.com
Arequipa - Perú



VIII. RESULTADOS

pH	5,45
Mat. Grasa g/100	0,39
Densidad g/cc a 15°C	1,02
Sólidos Totales g/100 (%)	5,73
Proteínas g/100 (%)	1,99
Agua adicionada g/100 (%)	37

IX. METODOS DE ENSAYO EMPLEADOS

Determinación de pH, materia grasa, densidad, lactosa, sólidos totales, proteínas y agua adicionada por el Método de Ultrasonido. Lactoscan.

Nota: Los resultados sólo se refieren a las muestras recepcionadas en el laboratorio.

Arequipa, 29 de Agosto del 2013



LABVETSUR
COPV 03-02

...es calidad





INFORME DE ENSAYO
DE CONTROL DE CALIDAD FISICOQUIMICA DE SUERO DE LECHE

I SISTEMA DE MUESTREO EMPLEADO:

Muestreo realizado por el solicitante.

II. DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre Alexandra Barrios Eguiluz
Dirección Urb. Independencia Americana A1 Umacollo

III. DATOS DEL SERVICIO

No. De diag 850
Referencia de LVS V8/12
Fecha de envío 11/12/2013
Servicio solicitado Examen Fisicoquímico

IV. DATOS DE LA MUESTRA

Nombre de la muestra Suero de leche
Presentación En envases de vidrio
Fecha de recolección 11/12/2013
Lugar de recolección No indica

V. ASPECTOS TECNICOS DEL MUESTREO

Muestreado por El interesado
Fecha del muestreo 11/12/2013
Condición de la muestra Aparentemente en buenas condiciones
No. De unidades de muestra Dos (02)

VI. PROPÓSITO DEL ENSAYO

Control de Calidad de Leche según solicitud del interesado

VII. ESPECIFICACION TECNICA:

No aplica

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A
Teléfonos: 054-213677 - 232175
e-mail: labvetsur@hotmail.com
Arequipa - Perú



VIII. RESULTADOS

	M 1
pH	6,05
Mat. Grasa g/100	0
Densidad g/cc a 15°C	1,0182
Sólidos Totales g/100 (%)	5,7
Proteínas g/100 (%)	1,94
Agua adicionada g/100 (%)	38,0

IX. METODOS DE ENSAYO EMPLEADOS

Determinación de pH, materia grasa, densidad, lactosa, sólidos totales, proteínas y agua adicionada por el Método de Ultrasonido. Lactoscan.

Nota: Los resultados sólo se refieren a las muestras recepcionadas en el laboratorio.

Arequipa, 11 de Diciembre del 2013




 Dr. Claudia Ciroga Mera
 COP 35333



es calidad