

## Artículo original

# Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes

Carmaña Padín González<sup>a,\*</sup>, Mario Díaz Fernández<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Botánica I y Laboratorio LIADSA/CIB. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, estado Falcón, Venezuela. <sup>b</sup>Laboratorio de Biotecnología. Universidad de Oviedo, Asturias, España.

Recibido 15 de julio de 2009; aceptado 22 de septiembre de 2009

**Resumen:** Las fermentaciones alcohólicas son realizadas a bajas concentraciones de azúcares, para evitar la inhibición por productos o sustratos. La fermentación alcohólica extractiva es utilizada en procesos limitados por la concentración de etanol final. Se estudió la fermentación alcohólica del lactosuero evitando la inhibición del *Kluyveromyces marxianus*, con la adición de solventes de extracción (ácido oleico, hexadecano, butil laurato y aceite de soja) como extractantes del etanol. Se evaluó la biocompatibilidad, cinética de extracción de los solventes, consumo de sustrato, producción de etanol, crecimiento celular (sin solventes y con solventes seleccionados como mejores extractantes y biocompatibles) y rendimientos globales. El ácido oleico y el aceite de soja fueron los mejores solventes de extracción. La velocidad específica de crecimiento se incrementó con el uso de solventes, siendo mayor con el uso de aceite de soja. La lactosa consumida fue de 97 g/L para la fermentación extractiva con ácido oleico, 81,2 g/L con aceite de soja, y 64 g/L para la fermentación convencional. Se obtuvieron 53 y 44 g/L de etanol con ácido oleico y aceite de soja respectivamente, y 35 g/L de etanol con la fermentación convencional. Queda demostrado que la fermentación alcohólica usando ácido oleico puede ser usada para reducir la concentración de etanol en el medio y evitar la inhibición de la levadura en el proceso, lo que conlleva a la posibilidad de usar un sustrato con altas concentraciones de azúcares, produciendo un incremento en la productividad del sistema.

**Palabras clave:** lactosuero, fermentación alcohólica, fermentación extractiva, *Kluyveromyces marxianus*

## Lactoserum alcoholic fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and organic solvents as extractants

**Abstract:** Alcoholic fermentations are done under low sugar concentrations to avoid product or substrate inhibition. Extractive alcoholic fermentation is used in processes limited by the final ethanol concentration. Lactoserum alcoholic fermentation avoiding the inhibition of *Kluyveromyces marxianus* by the addition of extraction solvents (oleic acid, hexadecane, butyl laureate and soy oil) as ethanol extractants was studied. Biocompatibility, extraction kinetic of the solvents, substrate use, ethanol production, cell growth (without solvents and with solvents selected as the best extractants and biocompatible), and global yield were evaluated. Oleic acid and soy oil were the best extraction solvents. Specific growth speed was increased by the use of solvents; the greatest increase was obtained with soy oil. Lactose consumption was 97 g/L for oleic acid extractive fermentation, 81.2 g/L for soy oil, and 64 g/L for conventional fermentation. The ethanol yield was 53 and 44 g/L with oleic acid and soy oil fermentation respectively, and 35 g/L with conventional fermentation. This study demonstrates that oleic acid alcoholic fermentation can be used to reduce the ethanol concentration in the medium and to avoid the inhibition of the yeasts during the process, which entails the possibility of using substrates with high sugar concentrations, obtaining an increase in the productivity of the system.

**Keywords:** lactoserum, alcoholic fermentation, extractive fermentation, *Kluyveromyces marxianus*

\* Correspondencia:  
E-mail: cpadin@cantv.net

### Introducción

El lactosuero es un subproducto de la separación de la cuajada durante el proceso de fabricación del queso y uno

de los desechos más contaminantes de la industria alimentaria. Cada kilogramo de queso producido genera 9 kilogramos de suero y anualmente, a nivel mundial, se producen 110 millones de toneladas [1]. Su composición química

ca ha permitido su utilización como aditivo funcional en varios alimentos [2-4].

El procesamiento biotecnológico fermentativo del lactosuero genera productos para el sector agroindustrial como proteína unicelular, proteasas, galactosidasa, glicerol, ácido acético y láctico [5] y bebidas alcohólicas [6]. Para la obtención de estos productos se utilizan *Saccharomyces cerevisiae*, *Serratia marcescens*, *Candida pelliculosa*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Kluyveromyces fragilis* y/o *Kluyveromyces marxianus* [7-10] y recientemente el *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* [5].

*Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*), era conocida anteriormente como *S. fragilis* y *K. fragilis* [11]. Ha sido aislada de fruta, queso, yogurt [8], leche [12], fermentaciones espontáneas [13], y se ha utilizado en el procesamiento del lactosuero; fermenta galactosa, sacarosa, rafinosa, lactosa, crece a temperaturas entre 20-30°C y pH 4,5-5, y con ella se obtienen etanol, glicerol, enzimas y proteína unicelular. Es una de las pocas levaduras que posee la capacidad de hidrolizar la lactosa y fermentar los azúcares eficientemente; el alcohol producido puede emplearse en la industria farmacéutica, de cosméticos y pudiera ser usado potencialmente como combustible alternativo. La lactosa proveniente del lactosuero puede ser directamente fermentable por algunos microorganismos evitando su presencia en el agua de desecho; así pues podría servir como excelente materia prima para la fermentación alcohólica, particularmente en procesos de alta productividad. De tal manera que es una buena elección como medio de cultivo para llevar a cabo procesos biotecnológicos [7].

Actualmente, la baja productividad de la fermentación clásica y la inhibición por productos del crecimiento celular a determinadas concentraciones de etanol [14,15], han conducido a fermentaciones de larga duración y elevados costos de producción. Es necesario desarrollar procesos que aumenten la productividad, mediante técnicas no convencionales como el uso de ingeniería de separación, para eliminar la inhibición de la levadura por productos metabólicos y aumentar la productividad del proceso de fermentación, a fin de reducir los costos energéticos de la recuperación de etanol cumpliendo con los estándares de calidad [16].

Adicionalmente, el impacto ambiental que producen ciertas tecnologías tradicionales de separación, ha hecho que la investigación sobre esquemas alternativos y no convencionales sea mucho más intensa [15]. Se han estudiado varios procedimientos para obtener fermentaciones con altos contenidos de etanol. Entre ellos se encuentra el uso de microorganismos modificados genéticamente, capaces de utilizar altas concentraciones de azúcares y con tolerancia a altas concentraciones de etanol. Alternativamente se ha estudiado la ingeniería de fermentación de separación [17]. Otros procedimientos recomendados son la destilación en vacío [18], la fermentación flash [19], los absorbentes sólidos porosos [20] y la fermentación extractiva [21].

Un enfoque razonable para aumentar la productividad del proceso de fermentación alcohólica es la remoción del producto que causa la inhibición, mediante un agente ex-

tractivo biocompatible (solvente) al migrar el etanol a la fase del solvente. Este proceso se denomina fermentación extractiva y combina la extracción líquido-líquido con el cultivo de microorganismos. La fermentación extractiva podría ser uno de los métodos más baratos para recuperar etanol cuando se encuentra el solvente apropiado. Desde el punto de vista químico, las características más importantes del solvente de extracción son: capacidad de extracción del producto de fermentación sobre el agua, biocompatibilidad con el microorganismo, baja solubilidad acuosa y estabilidad química y térmica [22]. La técnica ha sido utilizada favorablemente con *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium acetobutylicum* y *C. kefir* (anteriormente *C. pseudotropicalis*) [20,22,23], demostrando una mejora potencial sobre los métodos convencionales [21,23,25-28].

El objetivo de esta investigación fue estudiar la fermentación alcohólica del lactosuero evitando la inhibición del *K. marxianus*, con la adición de solventes de extracción (ácido oleico, hexadecano, butil laurato y aceite de soja) como extractantes del etanol. Para ello se estudiaron la velocidad específica de crecimiento de *K. marxianus*, consumo de azúcar, producción de etanol y rendimientos globales, sin la adición de solventes y con la adición de solventes no tóxicos con alta capacidad de extracción de etanol.

Cabe resaltar que el estudio realizado no ha sido reportado para lactosuero y *K. marxianus*. La información aquí presentada constituye una base de datos importante para la generación de futuras investigaciones referidas a producción y separación de etanol a partir de lactosuero.

## Materiales y métodos

**Microorganismo:** La levadura utilizada en la presente investigación fue *K. marxianus*, procedente de la colección Española de Cultivos Tipo (CECT) N° 1123, conservada por liofilización a 4°C en un cultivo puro y mantenida en solución de glicerol al 40% en congelación. La activación se realizó en 10 ml de medio líquido de TYED (Triptona 2%, extracto de levadura 1% y D-glucosa 2%) incubado a 30°C y con agitación a 200 rpm por 24 horas, sembrado por agotamiento y transferido a placas de petri con medio TYED sólido, incubado a 30°C, hasta observar crecimiento de colonias, las cuales fueron conservadas en nevera hasta 3 meses.

**Preparación del inóculo:** El cultivo de *K. marxianus* se repicó en una fiola de 50 ml conteniendo 10 ml de medio TYED; 24 horas más tarde se empleó como inóculo 100 ml de medio fresco.

**Substrato:** Se empleó lactosuero en polvo denominado RENVLAT 1300, suministrado por la empresa RENVY PICOT (Anleo, Asturias, España), reconstituido al 20% p/p, (conteniendo 128 g/L de lactosa), por ser la concentración donde se detectó el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento celular por efecto de la concentración de alcohol alcanzada en el proceso [15]. El lactosuero reconstituido fue filtrado mediante flujo tangencial con dos membra-

nas de polisulfona de tamaño de 0,3  $\mu\text{m}$  y posterior filtración con membrana de nitrato-celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

*Valoración de la biocompatibilidad de los solventes utilizados con K. marxianus:* Se evaluaron 4 solventes: ácido oleico, aceite de soja, hexadecano y butil laurato, utilizando las relaciones 0:1; 1:1; 2:1 y 3,5:1 solvente/medio de fermentación [21,27]. Se prepararon fiolas de 400 ml, conteniendo 100 ml de lactosuero reconstituido al 20% p/p., inoculados al 10% v/v con un cultivo de *K. marxianus* en fase exponencial y colocados en incubación a 30°C y agitación a 200 rpm. Al cabo de 8 horas, se añadió a cada fiola la cantidad de 0, 100, 200 y 350 ml del respectivo solvente y se mantuvieron las mismas condiciones experimentales por 31 horas más. Una alícuota de 1 ml, con tres repeticiones, fue tomada en 6 ocasiones para medir variación de la biomasa y determinar la velocidad específica de crecimiento.

*Cinética de extracción de etanol con los solventes estudiados:* Se evaluaron 4 solventes: ácido oleico, aceite de soja, hexadecano y butil laurato, utilizando diferentes relaciones 0:1; 1:1; 2:1 y 3,5:1 solvente/medio de fermentación [22,28]. Se utilizaron fiolas de 500 ml conteniendo 100 ml de lactosuero reconstituido al 20% p/p, 63 ml/L de etanol y la cantidad de 0, 100, 200 y 350 ml del solvente correspondiente, incubados a 30°C con agitación a 200 rpm. Una alícuota de 1 ml, con tres repeticiones, fue tomada en la fase acuosa en 6 ocasiones, para medir capacidad de extracción del solvente del medio de fermentación [28].

*Coefficiente de distribución:* Se colocaron en fiolas de 250 ml volúmenes constantes de solvente (ácido oleico y aceite de soja) y lactosuero reconstituido al 20% p/p en relación 1:1 en diferentes concentraciones de etanol hasta 10% v/v, agitados a 200 rpm a 30°C hasta alcanzar el equilibrio [21,28]. Se tomaron alícuotas en la fase orgánica y se determinó la concentración de etanol. Seguidamente se estimó la concentración de etanol en la fase acuosa y se determinó el coeficiente de distribución ( $K_p$ ) de los solventes [28].

*Pruebas de fermentación extractiva:* Se prepararon fiolas de 400 ml, conteniendo 100 ml de lactosuero reconstituido al 20%, inoculados al 10% v/v con un cultivo de *K. marxianus* en la fase exponencial, incubados a 30°C y agitados a 200 rpm. Al cabo de 8 horas se añadieron 100 ml de los solventes seleccionados (ácido oleico y aceite de soja) en relación 1:1 en sus respectivas fiolas, manteniéndolos en las mismas condiciones experimentales por 30 horas. Una alícuota de 1 ml, con tres repeticiones, fue tomada en 10 ocasiones para los respectivos análisis. Para la determinación del contenido de etanol se tomaron muestras en la fase orgánica y acuosa. Para los análisis del consumo de lactosa y crecimiento celular se tomaron muestras en la fase acuosa [28].

*Métodos de análisis:*

*Biomasa:* La concentración de biomasa se determinó turbidimétricamente, midiendo la absorbancia de la muestra en un Spectronic 20, a una longitud de onda de 660 nm [28,29].

*Consumo de azúcares totales:* Se utilizó el método de la antrona para la medición de los azúcares totales [28,30].

*Producción de etanol:* La concentración de etanol se determinó por cromatografía de gases, empleando un cromatógrafo Shimadzu, modelo GC.14B, equipado con una columna capilar Supelcowax 10 (Supelco), de 60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. Para las inyecciones se dispuso de un autoinyector, marca Shimadzu, modelo AOC. 20i. La temperatura del inyector para la fase acuosa fue de 200 °C y la del detector de 230 °C. La temperatura del inyector y el detector para la fase orgánica fue de 300 °C. Se empleó helio como gas transportador a una presión de 150 kPa. El volumen inyectado para el análisis fue de 5  $\mu\text{l}$ . Los cromatogramas obtenidos se registraron y procesaron en un integrador Chromatopac C-R64 [28].

*Diseño y análisis estadístico:* Para el estudio de la valoración de la biocompatibilidad de los solventes con *K. marxianus* y la cinética de extracción de etanol, se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con estructura factorial de 4 x 4, donde un factor fueron los cuatro solventes (ácido oleico, aceite de soja, hexadecano y butil laurato) y el otro factor las cuatro relaciones (0:1, 1:1, 2:1 y 3,5:1 solvente/medio de fermentación). Para las pruebas de fermentación se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con una estructura factorial de 2 x 2, donde un factor fueron 2 solventes (ácido oleico y aceite de soja) y el otro factor las dos relaciones (0:1 y 1:1 solvente/medio de fermentación). Los datos correspondientes al estudio de la valoración de la biocompatibilidad, la cinética de extracción y pruebas de fermentación extractiva fueron procesados estadísticamente a través del programa INFOS-TAT, realizando un análisis de varianza (ANOVA). Se compararon las medias de tres repeticiones a través de un test de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05.

## Resultados y discusión

*Efecto del solvente sobre el crecimiento celular:* El análisis de varianza no mostró diferencias significativas en la relación solventes/medio de fermentación, sobre el crecimiento de *K. marxianus*. Se demostró que la levadura no se inhibió por efecto de los solventes ni por la cantidad de los mismos añadida al medio de fermentación. La biomasa total al final del proceso estuvo entre 5,2 - 6,1 g/L para el solvente ácido oleico; 5,6 - 6,5 g/L para el solvente hexadecano; 6,4 - 6,9 g/L para el solvente butil laurato y 6,9 - 7,0 g/L para el aceite de soja. En el caso del proceso donde no fue añadido solvente al medio de fermentación, la biomasa total fue de 6,9 g/L (Figura 1). Esto demuestra que los solventes no afectan el crecimiento celular de la levadura. Así mismo, la velocidad específica de crecimiento

celular no mostró diferencias significativas a lo largo de la fase exponencial, manteniéndose entre valores de  $0,12 - 0,16 \text{ h}^{-1}$ , resultados que coinciden con los reportados por otros autores [31].

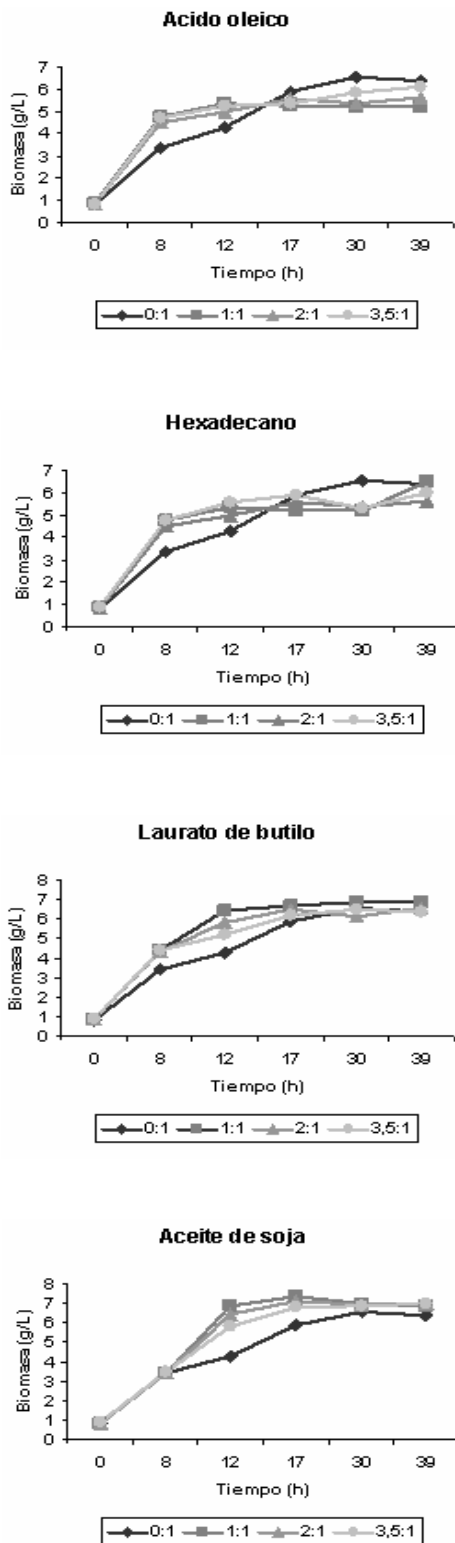


Figura 1. Efecto de la relación solvente/medio de fermentación (0:1; 1:1; 2:1 y 3,5:1) sobre la biomasa de *Kluyveromyces marxianus*

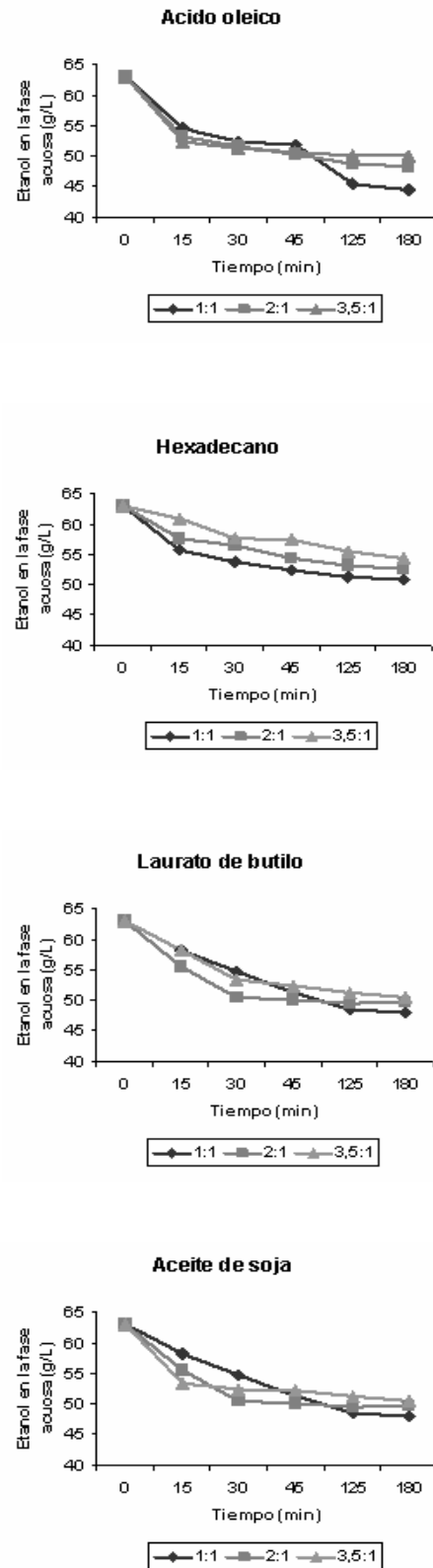


Figura 2. Cinética de extracción del etanol usando diferentes relaciones de solvente/medio de fermentación (1:1; 2:1 y 3,5:1)

*Efecto del solvente sobre la cinética de extracción:* En todos los casos, la cinética del proceso de extracción del

alcohol en el medio de fermentación tendió a ser más lenta al incrementar el volumen del solvente (ácido oleico, hexadecano, butil laurato y aceite de soja) (Figura 2). El equilibrio se alcanzó a las tres horas para la relación 2:1 y 3,5:1; no así para la relación 1:1 de ácido oleico, hexadecano, aceite de soya/ medio de fermentación. Para las relaciones 1:1 y 2:1 de butil laurato/medio de fermentación, el equilibrio no se alcanzó en ningún caso a las 3 horas. Se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de etanol en la fase acuosa al final de proceso: 45, 48 y 50 g/L para la relación ácido oleico/medio de fermentación 1:1 y 2:1 y 3,5:1 respectivamente. Para el solvente hexadecano no se evidenciaron diferencias significativas; la concentración de etanol en la fase acuosa al final del proceso fue de 51, 53 y 51 g/L para la relación solvente/medio de fermentación 1:1; 2:1 y 3,5:1 respectivamente. Por otro lado, la concentración de etanol en la fase acuosa al final del proceso fue significativa ( $p=0,0234$ ), con 48, 50 y 51 g/L para la relación butil laurato/medio de fermentación 1:1, 1:2 y 3,5:1 respectivamente. La concentración de etanol en la fase acuosa al final del proceso fue significativa, con 47, 48 y 51 g/L para la relación aceite de soja/medio de fermentación 1:1; 1:2 y 3,5:1 respectivamente. Estos resultados demuestran que aumentar el volumen de solvente no implica mayor capacidad de extracción de etanol en el medio de fermentación y además encarece los beneficios del método.

Se evidenciaron diferencias significativas ( $p=0,0334$ ) en la interacción solvente y concentración del mismo en el medio de fermentación. Los resultados demuestran que el ácido oleico y el aceite de soja en la relación 1:1 tuvieron mayor capacidad de extracción, ya que el etanol en la fase acuosa fue de 45 y 47 g/L respectivamente, habiendo partido de una concentración de 63 g/L. La fermentación extractiva podría ser el método más económico para eliminar etanol del medio de fermentación, siempre y cuando se seleccionen solventes biocompatibles en cantidades óptimas [22,23].

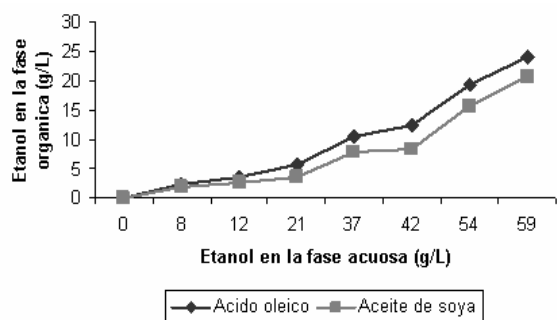
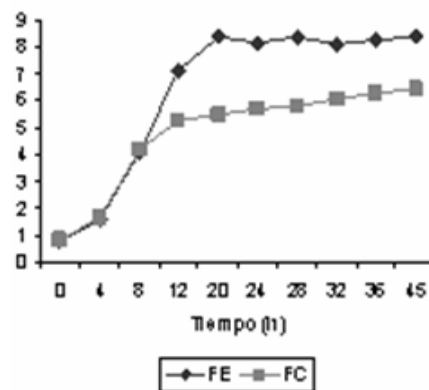


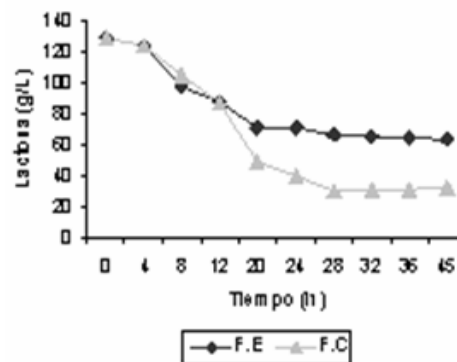
Figura 3. Distribución del etanol utilizando ácido oleico y aceite de soja en medio de fermentación en relación 1:1.

**Equilibrio de distribución del etanol:** El coeficiente de distribución no se mantuvo constante y además hubo una tendencia al aumento cuando se incrementó la concentración de etanol en el lactosuero reconstituido, en la relación probada 1:1. El coeficiente de distribución fue de 0,3 – 0,43 para el caso del solvente ácido oleico y 0,17 – 0,35

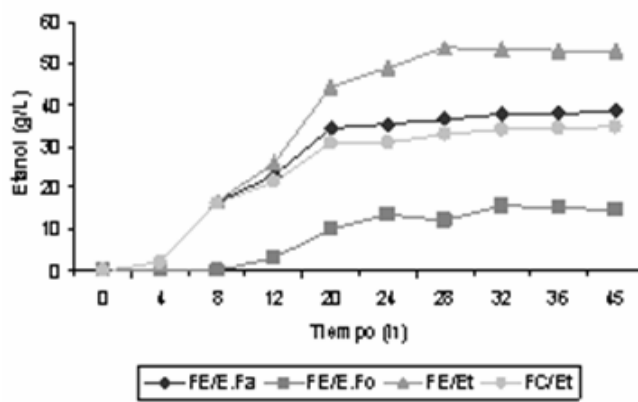
para el aceite de soja. Los resultados coinciden con los reportados por otros autores [22-24].



Crecimiento celular por fermentación extractiva (FE) con ácido oleico (1:1) solvente/medio de fermentación vs. fermentación convencional (FC)



Consumo de lactosa por fermentación extractiva con ácido oleico (FE) vs. fermentación convencional



Producción de etanol por fermentación extractiva con ácido oleico en la fase acuosa (FE/E.Fa); fase orgánica (FE/E.Fo) y etanol total (FE/Et) vs. producción de etanol por fermentación convencional (FC/Et)

Figura 4. Fermentación extractiva en relación 1:1 ácido oleico/medio de fermentación, comparada con una fermentación convencional.

**Fermentación extractiva:** Se detectaron diferencias significativas ( $p=0,0488$ ) en cuanto a la cantidad de etanol producida al final del proceso de fermentación convencio-

nal (35 g/L) y cuando fue añadido ácido oleico (53 g/L) y aceite de soja (44 g/L). Igualmente se evidenciaron, al final del proceso, diferencias significativas ( $p=0,0052$ ) en cuanto al etanol en la fase orgánica para el ácido oleico (14,4 g/L) y el aceite de soja (9,4 g/L). Así mismo, se detectaron diferencias significativas en cuanto al etanol en la fase acuosa al final del proceso de fermentación con ácido oleico (39 g/L) y aceite de soja (34,3 g/L). Por otro parte, se evidenciaron diferencias significativas ( $p=0,0461$ ) en el consumo de lactosa en el medio de fermentación con ácido oleico (97 g/L) y aceite de soja (81 g/L). La lactosa residual en el medio de fermentación fue significativa ( $p=0,0456$ ) para ácido oleico (32 g/L) y aceite de soja (47 g/L) en comparación con la fermentación convencional (64 g/L). El consumo de lactosa fue mayor cuando se usaron ácido oleico y aceite de soja como extractantes. El consumo de lactosa fue de 76% para la fermentación extractiva usando ácido oleico, de 63% usando aceite de soja y de 50% en la fermentación convencional, quedando un 24%, 37% y 50% de azúcar del lactosuero sin consumir, respectivamente (Figuras 3 y 4; tabla 1), resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores [20-23]. Los solventes de extracción permitieron la prolongación del crecimiento de *K. marxianus*, permitiendo un mayor consumo de lactosa y mayor producción de etanol [23].

Tabla 1. Rendimientos globales de una fermentación convencional y fermentaciones extractivas usando ácido oleico y/o aceite de soja.

	Fermentación extractiva		Fermentación convencional
	Acido oleico	Aceite de soja	
Lactosa residual (g/L)	32	47	64
Consumo de lactosa (g/L)	97	81,2	64
Concentración de etanol en la fase acuosa (g/L)	39,3	30,4	35
Concentración de etanol en la fase orgánica (g/L)	17,03	13,41	-
Etanol total (g/L)	53	44	35
Rendimiento de etanol. Y p/s (g etanol/g. lactosa)	0,55	0,54	0,53
Biomasa final (g/L)	8,4	8,8	6,5
Rendimiento de biomasa. Y x/s (g. etanol /g. lactosa)	0,09	0,11	0,10
Productividad total (g/L.h)	1,2	1,9	0,8
Eficiencia %	81	67	53
Etanol esperado/Etanol total %			

Lactosa inicial: 128g/L; Tiempo de fermentación: 45 horas; Etanol teórico: 65,28 g/L. El rendimiento estequiométrico de 1 g de glucosa en etanol es de 0,511g/g [31].

*K. fragilis* produjo más etanol cuando se utilizaron extractantes en el medio de fermentación. La concentración inicial de lactosa fue de 128 g/L para todas las fermentaciones. La producción de etanol fue de 53 g/L, 44 g/L y 35 g/L para las fermentaciones extractivas con ácido oleico, aceite de soja y para la fermentación convencional respectivamente, sin embargo según el cálculo teórico de etanol esperado, eran de 65,2 g/L (Tabla 1). Este resultado ilustra los beneficios de la técnica extractiva: se logra un mayor consumo de lactosa y se produce más etanol en un periodo de tiempo relativamente similar al proceso convencional.

El rendimiento del producto sobre el sustrato obtenido para la fermentación convencional está de acuerdo con aquellos valores determinados por otros autores [16,20,27]. Los resultados muestran que el rendimiento total de etanol sobre la lactosa permanece esencialmente constante en las dos fermentaciones extractivas y la fermentación convencional, un resultado avalado por datos publicados para otros organismos [20,21,23,27].

El contenido de etanol en fase acuosa en la fermentación convencional y las fermentaciones extractivas tuvieron similares resultados para este parámetro, pero la adición del solvente produce la extracción del etanol en el medio de fermentación, permitiendo que *K. fragilis* siga metabolizando la lactosa y produciendo más etanol (Tabla 1).

Al comparar la producción volumétrica de la fermentación convencional (0,77g/L.h) y las fermentaciones extractivas con ácido oleico y aceite de soja, se logró un aumento significativo de la producción con ácido oleico (1,66 g/L.h) y con aceite de soja (1,40 g/L.h), de acuerdo con las tendencias observadas en el consumo de lactosa (Tabla 1). Por otra parte, el uso de extractantes reflejó un aumento de la eficiencia del proceso fermentativo, con 77%, 65% y 50% para ácido oleico, aceite de soja y fermentación convencional respectivamente, resultados que coinciden con los reportados por otros autores [22,23]. Este rendimiento es importante y demuestra que, el sistema extractivo probado puede operar más eficientemente para convertir una cantidad dada de sustrato, evitando de esta manera la inhibición de la levadura por efecto de la concentración de etanol alcanzada en el medio de fermentación [22,23].

## Conclusiones

Los solventes utilizados en estos estudios, ácido oleico, hexadecano, butil laurato y aceite de soja, no afectaron el crecimiento celular de *K. marxianus*. Esto evidencia la biocompatibilidad de los mismos con la levadura.

La capacidad de extracción de los solventes fue mayor para la relación 1:1 solvente /medio de fermentación y fue menor al incrementar el volumen del solvente en el medio de fermentación. Los solventes que se comportaron como mejores extractantes fueron ácido oleico y aceite de soja.

La utilización de extractantes como ácido oleico y aceite de soja, biocompatibles con *K. marxianus*, mostró un incremento en el consumo de lactosa y una mayor producción de etanol, lo que conlleva a la solución del problema de utilización de sustratos con alto contenido de lactosa en los medios de fermentación alcohólicas. Este incremento ilustra los beneficios de la técnica extractiva, permitiendo al microorganismo consumir más lactosa y producir más etanol en un periodo de tiempo similar al proceso convencional.

Para que un proceso de fermentación alcohólica sea eficiente usando como sustrato lactosuero y *K. marxianus*, se recomiendan concentraciones de lactosa de 128 g/L y el uso de ácido oleico como extractante, para evitar que el proceso sea inhibido por el etanol obtenido, y dar valor añadido a un subproducto, considerado el contaminante más abundante de la industria alimentaria.

## Referencias

1. Reciclar la leche. Breves de Ciencia y Tecnología. Centro de Divulgación Científica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Microsemanario 2003; 487. Disponible en: <http://www.fcen.uba.ar/prensa/micro/2003/ms487.htm>. Acceso 16 de abril de 2009.
2. Linden G, Lorient D. Bioquímica agro-industrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Editorial Acribia, Zaragoza, España; 1996. pp 215-30.
3. Hinrichs J. 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. Int Dairy J. 2001; 11: 495-503.
4. McIntosh GH, Royle PJ, Le Leu RW, Regester GO, Jhonson MA, Grinsted RL, et al. Whey proteins as functional food ingredients. 1998; 8:425-34.
5. Sanchez N, Ramirez D, Zapata A. Evaluation of an extractive fermentation system for the production of lactic acid using whey as substrate. Vitae. 2007; 14:27-34.
6. De Wit JN. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. J Dairy Sci. 1998; 81: 597-608.
7. Gouch S, Flynn O, Hack C, Marchant R. Fermentation of molasses using thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimization of media supplements. Appl Microbiol Biotechnol. 1996; 46:187-90.
8. Maubois J. Whey, its biotechnological signification. Biotechnology. 1989; 2: 814-24.
9. Moresi M, Trunfio A, Parente E. Kinetics of continuous whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. J Chen Tech Biotechnol. 1990; 49: 205-22.
10. Ustariz FJ, Laca A, Garcia LA, Díaz M. Condiciones de fermentación para el incremento de la producción de proteasas por *Serratia marcescens* en lactosuero fresco. Rev Téc Ing Univ Zulia. 2008; 31: 79-89.
11. American Type of Culture Collection (ATCC). Catalogue of Yeasts. 18th edition. Manassas, VA 20108, USA. 1991. pp 230.
12. Roostita R, Fleet G. Growth of yeast in milk and associated changes to milk composition. Int J Food Microbiol. 1996; 31: 205-19.
13. Lanchance M. Yeast communities in natural tequila fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek. 1995; 68: 151-60.
14. Viejo A. Producción de una bebida alcohólica a partir de lactosuero. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Química. Universidad de Oviedo. España. 1996.
15. Padin C, Díaz M. Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. Rev Soc Ven Microbiol. 2006; 26: 35-41.
16. Montoya M, Quintero J, Sánchez O, Cardona C. Efecto del esquema de separación del producto en la producción biotecnológica de alcohol carburante. En: II Simposio sobre biofábricas. Avances de la biotecnología en Colombia. Medellín, Colombia. 2005.
17. Campbell J, Bender G, Marquis R. Barotolerant variant of *Streptococcus faecalis* with reduced sensitivity to glucose catabolite repression. Can J Microbiol. 1985; 31:644-50.
18. Cysewski G, Wilke C. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. Biotechnol Bioeng. 1977; 19:1125-43.
19. Ghose T, Tyagi H. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I: Batch vs continuous system. Biotechnol Bioeng. 1979; 21: 1381-400.
20. Minier M, Goma G. Ethanol production by extractive fermentation. Biotechnol Bioeng. 1982; 24: 1565-79.
21. Hamdi K, Mehmetoğlu Ü. Strategies for reducing solvent toxicity in extractive ethanol fermentation. App Biochem Biotechnol. 1998; 75: 205-14.
22. Bruce L, Daugulis A. Solvent selection strategies for extractive biocatalysis. Biotechnol Prog. 1991; 7: 116-24
23. Todd D, Jones J, Havard M, Daugulis A. Ethanol production from lactose by extractive fermentation Biotechnology Letters. 1993; 15: 871-6.
24. Gutiérrez L, Sánchez O, Cardona C. Modeling of batch extractive fermentation for the fuel ethanol production. En: Memories of the 8th Conference of Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction (PRES 2005). Giardini Naxos, Italy.
25. Gyamerah M, Glover J. Production of ethanol by continuous fermentation and liquid-liquid extraction. J Chem Technol Biotechnol. 1996; 67: 145-52.
26. Lopez M, Berruela J, Díaz M. Absorption, distillation and extraction. European Federation of Chemical Engineering. World Party Meeting. Oviedo, Asturias. España. 1990.
27. Aires M, Cabral J, Novais J. Production of ethanol by immobilized *Saccharomyces bayanus* in an extractive fermentation system. Biotech Bioeng. 1987; 29: 1097-104
28. Padín C. Fermentación extractiva de alcohol de lactosuero. Proyecto de Investigación. Magister en Biotecnología Alimentaria. Ingeniería Química. Universidad de Oviedo. España. 2000.
29. Rhodes P, Stanturry P. Applied Microbial Physiology. Oxford University Press Ed., Oxford; 1997.
30. Scott T, Melvin E. Dextrin determination with anthrone. Ann Chem. 1953; 25: 1656-61.
31. Walter G. Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* NRRLy2415 during fermentation of lactose. J Chen Biotechnol. 1990; 49: 75-89.