

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

AAQ-ICBI

Área Académica de Química

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería



POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRODUCCIÓN DE 2-FENILETANOL A PARTIR DE LACTOSUERO COMO UNA ALTERNATIVA A LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Ambientales

Presenta:

Laura Conde Báez
Ingeniera Ambiental

Comité tutorial:

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa (Director)
Dr. Jesús Bernardo Páez Lerma
Dr. J. Roberto Villagómez Ibarra
Dr. Javier Castro Rosas

Pachuca, Hidalgo 2016



AAQ-ICBI/1607/2016.

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Comité Revisor asignado a la alumna C. Ing. Amb. Laura Conde Báez, del "Doctorado en Ciencias Ambientales", con número de cuenta 263643, que presenta el manuscrito de tesis titulado "Producción de 2-feniletanol a partir de lactosuero como una alternativa a la contaminación ambiental", después de revisar el trabajo antes referido, ha decidido autorizar la impresión del mismo hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
SECRETARIO	Dr. Jesús Bernardo Páez Lerma
VOCAL	Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
SUPLENTE	Dr. Javier Castro Rosas

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración,

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Mérida de la Reforma, Hidalgo, México, 07 de septiembre del 2016.

Dr. Claudio Arce Pozo
 Director del ICBI



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Mérida - Tlaxiangua km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mérida de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42194
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Dedicatoria

A mis padres, Naya Baéz y Jorge Conde por su amor, su apoyo incondicional, por su ejemplo de lucha y por sus sabios consejos.

A mi esposo, Cuauhtémoc por su amor, su paciencia y su entrega en cada momento para que yo pudiera concluir con ésta meta planteada en mi vida, que haría sin mi compañero de aventuras...gracias amor.

A mi hijo, Balam, por enseñarme su gran fortaleza e impulsarme con tan solo su existencia a seguir adelante en cada objetivo que me propongo.

A mis hermanas, Claudia y Fabiola, por ser ejemplo de lucha y su apoyo constante.

A mis suegros y cuñada. Alfredo Pineda, Aurora Muñoz y Xochilt, por su apoyo constante, por sus atenciones y por acompañarnos en cada paso.



Agradecimientos

Se agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada con No.317914

Quiero agradecer enormemente al Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa, director de ésta tesis, por su apoyo incondicional, su comprensión, su amistad y el aporte de sus conocimientos a este trabajo.

Hago extensivo mi agradecimiento a los integrantes de mi comité tutorial:

Al Dr. Javier Castro Rosas, por su disponibilidad en todo momento para resolver mis dudas y por permitirme aprender de su enorme experiencia en investigación.

Al Dr. Jesus Páez Lerma, por su apoyo constante en cada etapa de este proyecto, su enorme atención durante las estadías en el ITD y por el aporte de sus conocimientos a este proyecto.

Al Dr. J. Roberto Villagómez Ibarra, por aceptar ser parte de mi comité tutorial desde la propuesta a ello, por su apoyo y amabilidad en todo momento para resolver mis dudas y por permitirme aprender un poquito de toda su experiencia en RMN.

Por su apoyo en mis estadías en ITD y UPP:

Al Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz, al Dr. Arturo Abreu, al Dr. Jorge Gracida y a la Dra. Angélica Jiménez.

A Tina e Israel por sus consejos, enorme apoyo y amistad.

A mis compañeras y amigas de posgrado Nadia, Coco, Esme, Adri y Windy.

Al Dr. René por todo su apoyo en la última parte de etapa de doctorado.

A todos aquellos compañeros que conocí en el transcurso de ésta etapa, Bayona, Ricardo, Miguel, a todos los del lab de fisicoquímica y microbiología de alimentos.

A todos aquellos que me brindaron su amistad y me permitieron conocerlos un poco más Haydé, Maru, Dra. Paty e Ivonne.

En fin... después de cuatro años de aprendizaje y experiencias mil gracias!!!



Este trabajo se realizó en los laboratorios de Microbiología y Físicoquímica de Alimentos de la UAEH, así como en el laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Durango y en el laboratorio de Bioprocesos Ambientales de la Universidad Politécnica de Pachuca.





Los avances de éste trabajo se presentaron en los siguientes congresos:

XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. "Producción de alcohol fenilético (2-feniletanol) en lactosuero ácido por fermentación con *Kluyveromyces marxianus*. Guadalajara, Jalisco, México. 21 al 26 de Junio de 2015.

1ST Biotechnology World Symposium & 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. "Production of 2-phenylethanol by fermentation of whey with *Kluyveromyces marxianus*". Atliuetzia, Tlaxcala, México. October 13 to 16, 2014.

XI Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. "Obtención de bioetanol: Alternativa de solución a la contaminación por lactosuero". Mazatlán, Sinaloa. México. 5, 6 y 7 de Junio del 2012.



Los avances de éste trabajo fueron aceptados para ser publicados en:

Conde-Báez L., Castro-Rosas J, Villagómez-Ibarra J.R, Páez-Lerma J.B, Gómez-Aldapa C. 2016. Evaluation of Waste of the Cheese Industry for the Production of Aroma of Roses (Phenyl ethyl Alcohol). **Waste and Biomass Valorization**. DOI:10.1007/s12649-016-9654-6.

Conde-Báez L., Castro-Rosas J, Villagómez-Ibarra J.R, Páez-Lerma J.B, Gómez-Aldapa C. Uso de lactosuero ácido para la producción sustentable de aroma a rosas (2-feniletanol) con *Kluyveromyces marxianus*. **Revista Iberoamericana de Ciencias**. ISSN 2334-2501.



La metodología sobre la producción de 2-feniletanol se encuentra en proceso de patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) con el título “Procedimiento para obtener 2-fenil etanol a partir de lactosuero crudo”; registro **MX/a/2015/016861.**



La propuesta de éste proyecto ganó el **PREMIO ESTATAL DE CIENCIA TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN 2015.**

En la terna de **INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.**



***De cuatro a seis semanas en el laboratorio pueden
ahorrar una hora en la biblioteca.***

G.C. Owar Deren, Dow Chemical Co.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	- 15 -
ÍNDICE DE TABLAS	- 18 -
RESUMEN	- 20 -
ABSTRACT	- 21 -
I. INTRODUCCIÓN	- 22 -
II. MARCO DE REFERENCIA	- 26 -
2.1 Lactosuero	- 27 -
2.1.1. Composición del lactosuero	- 27 -
2.1.2. Tipos de lactosuero	- 30 -
2.2. Consideraciones ambientales	- 31 -
2.3. Regulación y legislación ambiental	- 31 -
2.4. Tratamiento del lactosuero	- 33 -
2.4.1. Tratamiento biológico con valorización	- 33 -
2.4.1.1. Hidrólisis de lactosa	- 35 -
2.4.1.2. Hidrólisis química	- 36 -
2.4.1.2.1. Hidrólisis enzimática	- 36 -
	- 37 -
2.5. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	- 37 -
2.6. 2-feniletanol (2-FE)	- 40 -
2.6.1. Propiedades físicas y químicas del 2-FE	- 41 -
2.6.2. Fuentes naturales y Uso industrial	- 42 -
2.7. Síntesis bioquímica	- 43 -
2.7.1. Ruta de Ehrlich	- 43 -
2.7.2. Vía fenilpiruvato	- 44 -

2.8. Detección de 2-FE	- 45 -
2.8.1. Cromatografía de gases	- 45 -
2.9. Método de determinación estructural para 2-FE y lactosa	- 46 -
2.9.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	- 47 -
2.9.2. Polarimetría	- 47 -
JUSTIFICACIÓN	- 49 -
OBJETIVOS	- 51 -
OBJETIVO GENERAL	- 52 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 52 -
V. MATERIALES Y MÉTODOS	- 53 -
5.1. Selección de la cepa	- 55 -
5.2. Sustrato	- 55 -
5.2.1. Lactosuero dulce (LD) y Lactosuero ácido (LA)	- 55 -
5.2.2. Lactosuero de requesón (LR)	- 56 -
5.3. Análisis bromatológico del sustrato	- 56 -
5.4. Acondicionamiento del lactosuero	- 56 -
5.5. Producción de 2-feniletanol (2-FE)	- 57 -
5.6. Conteo de levaduras	- 58 -
5.7. Métodos analíticos	- 58 -
5.7.1. Cromatografía de gases (CG)	- 58 -
5.7.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)	- 59 -
5.7.4. Rotación óptica	- 59 -
5.7.5. Colorimetría de reflujo cerrado	- 60 -
5.7.6. Determinación de azúcares reductores con 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS)	- 60 -

5.8. Modelos matemáticos	- 61 -
5.8.1. Gompertz, Logístico y Richards	- 61 -
5.8.2. Monod	- 62 -
5.9. Análisis estadístico	- 64 -
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 65 -
6.1. Análisis bromatológico del sustrato (LD1, LD,LA y LR)	- 66 -
6.2. Selección de la cepa	- 68 -
6.3.1. Formulación 1(Agitación 180 RPM)	- 74 -
6.3. Evaluar el efecto de la concentración de L-FE sobre la producción de 2-FE con <i>K. marxianus</i> .	- 92 -
6.4.1. Formulación 2 (500 mg/L de L-FE en LD)	- 92 -
6.4.2. Formulación 3 (1000 mg/ L de L-FE en LD)	- 97 -
6.6. Evaluar el efecto de la concentración de L-FE y Sulfato de amonio sobre la producción de 2-FE	- 100 -
6.6.1. Formulación 4 (450 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1000 g/L de L-fenilalanina (L-FE) en LD).	- 100 -
6.6.2. Formulación 5 (900 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1000 mg/L de L-fenilalanina (L-FE) en LD).	- 105 -
6.6.3. Formulación 6 (1350 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1000 mg/L de L-fenilalanina (L-FE) en LD)	- 113 -
6.5. Evaluar el efecto de la producción de 2-FE sobre la reducción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).	- 117 -
CONCLUSIONES	- 124 -
BIBLIOGRAFÍA	- 126 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del mecanismo de mutarrotación de la lactosa (Jawad <i>et al.</i> , 2012).	- 28 -
Figura 2. Componentes del lactosuero (el patrón negro representa el valor máximo). Tomado de Prazeres <i>et al.</i> , 2012.	- 33 -
Figura 3. Subproductos del lactosuero líquido y deshidratado tomado de Nath <i>et al.</i> , 2015.	- 35 -
Figura 4. Modelo de regulación de la hidrólisis de lactosa en <i>Kluyveromyces marxianus</i> tomado de Texeira <i>et al.</i> , 2006.	- 37 -
Figura 5. Rutas metabólicas de <i>K. marxianus</i> para la producción de 2-FE.	- 39 -
Figura 6. Estructura molecular del compuesto 2-FE.	- 41 -
Figura 7. Ruta de Ehrlich para la síntesis de 2-FE.	- 44 -
Figura 8. Metabolismo de la L-fenilalanina por la vía fenilpiruvato.	- 45 -
Figura 9. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases tomado de Barqueros, 2006.	- 46 -
Figura 10. Polarímetro del equipo PE631136 micro cell utilizado en este trabajo.	- 48 -
Figura 11. Celda polarimétrica del equipo PE631136 micro cell utilizado en este trabajo.	- 48 -
Figura 12. Metodología para las fermentaciones de lactosuero dulce, ácido y de requesón seguida en este trabajo.	- 54 -
Figura 13. Cromatogramas (HPLC) de la concentración de lactosa y etanol en cinéticas de medio LPY para la cepa ITD00262.	- 69 -
Figura 14. Cromatograma (CG/FID) del compuesto con aroma a rosas 2-FE a las 24 h en LD1 a 28 °C/120 rpm.	- 70 -
Figura 17. Cromatograma (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD a 30°C/180 rpm.	- 75 -
Figura 20. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de lactosuero dulce a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	- 79 -

Figura 21. Ajuste de la ecuación de Monod para la inhibición por producto (rg etanol) de las cinéticas de lactosuero dulce a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	80 -
Figura 22. Ajuste de la ecuación de Monod para la velocidad de formación de producto (rp) de las cinéticas de LA a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	81 -
Figura 23. Cromatograma (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 96 h en LA a 30 °C/180 rpm.....	82 -
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en D ₂ O de la lactosa del LA. -	84 -
Figura 25. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de lactosuero ácido a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	85 -
Figura 26. Producción de 2-FE y etanol en cinéticas de LA, 30°C/180 rpm. ...	86 -
Figura 27. Velocidad de consumo de sustrato (-rs) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de lactosuero de requesón a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	88 -
Figura 31. Cromatogramas (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD con 500 mg/L de L-FE a pH 4.8 30 °C/180 rpm.	94 -
Figura 32. Velocidad de consumo de sustrato (-rs) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de LD con 500 mg/L L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	96 -
Figura 33. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las cinéticas de LD con 0.5 g/L de L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.....	97 -
Figura 34. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las cinéticas de LD con 1 g/L de L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.	99 -
Figura 35. Cromatogramas (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 96 h en LD con 450 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ y L-FE a 30 °C/180 rpm.	101 -
Figura 36. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de LD con 450 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm. ...	103 -
Figura 37. Velocidad de consumo de sustrato (-rs) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de LD con 450 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.....	104 -
Figura 40. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ del compuesto 2-FE en cinéticas de LD con 900 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ y L-FE a 30 °C/180 rpm.....	107 -

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en DMF del compuesto 2-FE en cinéticas de vinaza - 108 -

Figura 42. Espectro calculado con el software Chemdraw de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 2-FE..... - 109 -

Figura 43. Ajuste del modelo de Monod para la inhibición por producto de las fermentaciones de lactosuero dulce con 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm. - 110 -

Figura 44. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las cinéticas de LD con 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm. - 112 -

Figura 45. Cromatogramas (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD con 1350 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 4.8 30 °C/180 rpm. - 114 -

Figura 50. Análisis de reducción de costos para la formulación 3 de las cinéticas de LD a pH 4.8 30°C/180 rpm. - 120 -

Figura 51. Análisis de reducción de costos para el tratamiento C de las cinéticas de LD a pH 4.8 30°C/180 rpm. - 121 -

Figura 52. Análisis de reducción de costos para formulación 5 de las cinéticas de LD a pH 4.8 30 °C/180 rpm. - 123 -

Figura 53. Análisis de reducción de costos para formulación 6 de las cinéticas de LD a pH 4.8 30 °C/180 rpm. - 123 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del lactosuero dulce, ácido y de requesón	- 30 -
Tabla 2. Propiedades del compuesto 2-FE	- 42 -
Tabla 11. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero ácido con <i>K. marxianus</i> a 30 °C/180 rpm.	- 83 -
Tabla 12. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero de requesón con <i>K. marxianus</i> a 30 °C/180 rpm.	- 87 -
Tabla 15. Concentración de los distintos parámetros de las cinéticas de LD con 1 g/L de L-FE a 30 °C/180 rpm.	- 98 -
Tabla 16. Tabla comparativa de resultados de las cinéticas en LD con 500 y 1000 mg/L de L-FE a pH 4.8 30 °C/180 rpm.	- 100 -
Tabla 17. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con <i>K. marxianus</i> con 450 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ y L-FE a 30 °C/180 rpm.	- 102 -
Tabla 18. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con <i>K. marxianus</i> a 30 °C/180 rpm.	- 105 -
Tabla 19. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con <i>K. marxianus</i> con 1350 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ a 30 °C/180 rpm.	- 113 -
Tabla 22. Tabla comparativa de la concentración de la DQO en las cinéticas de LD a 0, 450, 900 y 1350 mg/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ a pH 4.8 30 °C/180 rpm.	- 119 -
Tabla 23. Tabla comparativa de la concentración de la DQO en las cinéticas de LD con 0.5 y 1 g/L de L-FE a pH 4.8 30 °C/180 rpm.	- 122 -



LISTA DE ABREVIATURAS

°C Grados Celsius.

DBO. Demanda Bioquímica de Oxígeno.

DQO. Demanda Química de Oxígeno.

et al. Y Colaboradores.

g. Gramo.

Kg. Kilogramo.

KDa. Kilodaltons.

L. Litro.

mL. Mililitros.

rpm. Revoluciones por minuto.

s. Segundo.

UFC. Unidades Formadoras de Colonias.

% V. Por ciento en volumen.

% W. Por ciento en peso.

RESUMEN

El lactosuero es un subproducto que se obtiene durante la elaboración de quesos. Éste es rico en lactosa y proteínas. Debido a esto, el lactosuero podría ser utilizado como sustrato para producir compuestos de alto valor como el 2-feniletanol (2-FE). Prácticamente, no existen estudios sobre el uso del lactosuero, producido por la industria de quesos, como sustrato de microorganismos para la producción de 2-FE. Se evaluó la producción de 2-FE por *Kluyveromyces marxianus* utilizando como sustrato tres tipos de lactosuero (dulce, ácido y de requesón) de una empresa productora de quesos. El pH del lactosuero se ajustó a 4.8, se pasteurizó a 63 °C/30 min y se inoculó con *K. marxianus*. El lactosuero inoculado se incubó en agitación (180 rpm) a 30 °C por 96 h. La identificación y cuantificación de 2-FE se realizó por cromatografía de gases. *K. marxianus* fue capaz de producir 2-FE a partir del lactosuero. La concentración máxima de 2-FE que se obtuvo fue de 1 g/L. Cabe señalar que durante la producción de 2-FE por *K. marxianus*, la concentración de la lactosa del lactosuero se redujo en un 99%. Mientras que la demanda química de oxígeno (DQO) se redujo en 97%. El lactosuero producido por la industria de quesos podrían ser usado como alternativa para la producción de 2-FE por *K. marxianus*. Este proceso además sería una alternativa para reducir la concentración de lactosa en el lactosuero, disminuyendo con ello, el impacto ambiental que provoca el lactosuero cuando es vertido al ambiente sin ningún tratamiento.

Palabras clave: 2-feniletanol, lactosuero dulce, *Kluyveromyces marxianus*.

ABSTRACT

Whey is a byproduct during cheese making. It is rich in lactose and proteins. Because of this, the whey may be used as substrate to produce high value compounds such as 2-phenylethanol (2-FE). Virtually no studies on the use of whey, produced by the cheese industry as a substrate for microorganisms for the production of 2-FE. The production of 2-FE by *Kluyveromyces marxianus* was assessed using whey substrate as a producer of cheese. The whey pH was adjusted to 4.8, was pasteurized at 63 °C/30 min and inoculated with *K. marxianus*. The inoculated whey was incubated with stirring (180 rpm) at 30 °C for 96 h. Identification and quantification of 2-FE was performed by gas chromatography. *K. marxianus* was able to produce 2-FE from whey. The maximum concentration of 2-FE that was obtained was 1 g/L. It should be noted that during the production of 2-FE by *K. marxianus*, the concentration of lactose from whey was reduced by 99%. While chemical oxygen demand (COD) was reduced by 97% . The whey produced by the cheese industry could be used as alternative for the production of 2-FE by *K. marxianus*. This process would also be an alternative to reduce the lactose concentration in the whey, thereby reducing the environmental impact caused when the whey is discharged to atmosphere without any treatment.

Keywords: 2-phenylethanol, whey, *Kluyveromyces marxianus*.



I.INTRODUCCIÓN

El lactosuero, es el líquido que queda después de la separación de la cuajada durante el proceso de fabricación del queso y contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche (**Parra et al., 2009; Prudêncio et al., 2014**). Se estima que producir 1 Kg de queso genera alrededor de 9 L de lactosuero (**Padín et al., 2006**). La producción de lactosuero a nivel mundial es de alrededor de 160 millones de toneladas al año, siendo Europa (86.27 millones de ton) y Estados Unidos (48.05 millones de ton), los principales productores (**INPA, 2009; Diniz et al., 2013**). En México, la producción de lactosuero es cercana a 1 millón toneladas por año (**Valencia et al., 2009**).

La industria láctea produce 2 tipos de lactosuero, conocidos comúnmente como lactosuero dulce y ácido, el primero se obtiene de la elaboración de quesos, en donde se utiliza la coagulación enzimática a un pH alrededor de 5.6. El lactosuero ácido se produce cuando la coagulación es por acidificación a un pH de 5.1 o menor (**Arrojo et al., 2003**). Sin embargo, existe un tercer tipo de lactosuero denominado requesón, resultado de la combinación de los dos anteriores. Independientemente del tipo de lactosuero, aproximadamente el 47 % del lactosuero se desecha en cuerpos de agua, o es descargado en suelos (**Dragone et al., 2011**). Los altos volúmenes generados y su contenido en materia orgánica, principalmente lactosa (40 - 60 g/L), proteínas (1.4 - 33.5 g/L) y grasa (0.08 - 10.6 g/L), lo convierte en un residual altamente contaminante cuando es vertido sin tratamiento al ambiente (**Prazeres et al., 2012; Carvalho et al., 2013**). Los valores de DBO (30-50 g/L) y DQO (60-80 g/L) presentes en el lactosuero, se encuentran por encima de las normas establecidas (**Spălățelu, 2012**). Su continua descarga ocasiona un rápido consumo de oxígeno, fenómenos de eutrofización, grasas de flotación, formación de espuma, salinización, acidificación, generación de olores desagradables, presencia de elementos biogénicos, entre otros (**Prazeres et al., 2013**). Sin embargo, la bioconversión del lactosuero, importante por su contenido en lactosa y considerado como un sustrato económico, es de gran interés para producir

compuestos de valor agregado (**Páez et al., 2012; Hadiyanto et al., 2014; Aggelopoulos et al., 2014**). Dentro de éstos compuestos se podría producir 2-FE ($C_8H_{10}O$), el cual es un alcohol con aroma a rosas. El 2-FE, es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, para la modificación de las composiciones organolépticas del sabor de fórmulas frutales, helados, dulces, bebidas sin alcohol, gelatinas, pudines, goma de mascar, entre otros (**Garavaglia et al., 2007**). En la industria farmacéutica tiene aplicación como anestésico local y antiséptico (**Lomascolo et al., 2001**). El 2-FE es utilizado también, en la elaboración de perfumes y cosméticos (**Etschmann et al., 2002**). Cabe señalar que actualmente la mayor producción de 2-feniletanol, se lleva a cabo por métodos químicos, lo que implica el uso de reactivos tóxicos, como benceno y óxido de estireno, además de elevadas temperaturas ($>300\text{ }^{\circ}C$) (**Achmon et al., 2013**).

Afortunadamente, la demanda de 2-FE obtenido por procesos bioquímicos es cada vez mayor (**Wittmann et al., 2002**). Mediante procesos bioquímicos se disminuye de manera considerable la contaminación ambiental. El 2-FE puede ser sintetizado por ciertas levaduras a través de dos rutas independientes, teniendo como precursor L-fenilalanina (**Celińska et al., 2013**). Se ha reportado que *K. marxianus* tiene la capacidad de producir altas concentraciones de 2-FE y de utilizar lactosa como fuente de carbono (**Gupte et al., 2010; Zhou et al., 2013**).

La producción de 2-FE utilizando *K. marxianus*, se ha realizado empleando diversos sustratos, en su mayoría sintéticos (melaza, mosto de uva, permeado de lactosuero, extracto de malta, base nitrogenada con extracto de levadura, base glucosa-peptona-extracto de levadura) (**Fabre et al., 1998; Wittmann et al., 2002; Etschmann et al., 2002, 2003, 2006; Garavaglia et al., 2007; Dragone et al. 2009**). No obstante, no se ha reportado el uso de lactosuero obtenido directamente de la producción de quesos como sustrato para la obtención de 2-FE. Por otro lado, el utilizar lactosa y proteínas, presentes en el lactosuero como sustrato para la producción de éste metabolito,



permitiría la disminución de la alta carga contaminante presente en este residual (**Zoppellari *et al.*, 2013**).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de 2-FE y la reducción de lactosa por *K. marxianus* a partir de lactosuero obtenido de la industria quesera sin ningún tratamiento previo.



II. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Lactosuero

El lactosuero fue descubierto hace unos 3000 años. Aparte de ser valorado como un agente medicinal en el siglo XVII y XVIII, éste ha sido considerado principalmente un desperdicio de la industria láctea, y por lo tanto destinado como un desecho (**Smithers et al., 2015**). A finales del siglo XX, las regulaciones impedían la disposición del lactosuero sin tratar (**Durham & Hourigan, 2007**). Al mismo tiempo, el reconocimiento del valor de los componentes del lactosuero se aceleró desencadenando avances tecnológicos para su procesamiento (**Nath et al., 2015**). Estos avances han continuado, enfocándose principalmente en la funcionalidad biológica de los componentes del lactosuero (**Uhrinova et al., 2000; Holland et al., 2010; Guimarães et al., 2010**).

2.1.1. Composición del lactosuero

La lactosa es el principal componente del lactosuero, es un disacárido formado por dos moléculas, α -D-glucosa y otra de β -D-galactosa (unidas por un enlace β -1,4-glicosídico), se define químicamente como 4-O- β -galactopyranosyl-D-glucopyranosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$ (**Guimarães et al., 2010**). Dependiendo del tipo de glucosa que intervenga en la molécula (α ó β), la lactosa puede tener dos formas isoméricas: α -lactosa o β -lactosa (Figura 1); que tienen propiedades fisicoquímicas completamente diferentes (solubilidad, cristalización, refracción de la luz, etc.) (**Almécija et al., 2006**). La forma β tiene una solubilidad mucho mayor, pero por mutarrotación se alcanza un equilibrio entre las dos formas. La forma cristalina α hidratada, que es la más frecuente, tiene numerosas conformaciones; de las cuales, la principal causante de la textura arenosa es la conformación conocida como —*tomahawk*l (hacha de guerra india) (**García-Garibay & Gómez-Ruiz, 1996**).

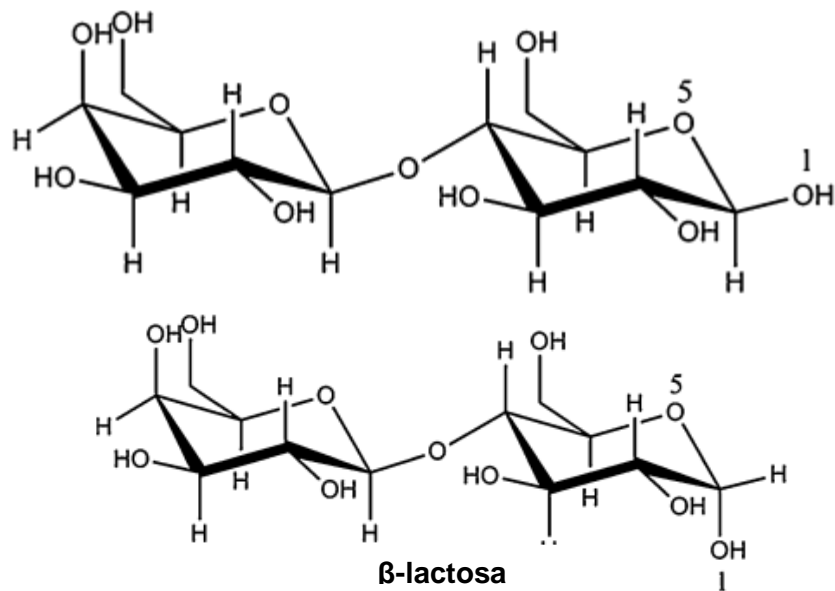


Figura 1. Representación del mecanismo de mutarrotación de la lactosa (Jawad *et al.*, 2012).

Entre las principales fracciones proteicas de la leche liberadas en el suero, se encuentran en mayor cantidad las proteínas globulares solubles β -lactoglobulina (β -LG) y α -lactoalbúmina (α -LA) en una relación 3:1 y como constituyentes menores seroalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina, proteasas peptonas y transferrina, que representan el 98% de las proteínas solubles (**Carrasco *et al.*, 2010**). Las sales presentes en el lactosuero son el NaCl y KCl (más de 50 %) y sales de calcio (principalmente fosfato), también contiene otros componentes, como ácido láctico (0.05 % w / v), ácido cítrico, compuestos de nitrógeno no proteico (urea y ácido úrico) y vitaminas del grupo B (**González *et al.*, 1996**).

La β -lactoglobulina (β -lg) es la más importante de las proteínas del suero, pues constituye el 50.8% de éste y el 9.8 % del total de las proteínas de la leche (**Holland *et al.*, 2010**). La estructura secundaria de la β -lg está compuesta de ocho láminas- β antiparalelas que forman un cáliz (**Amerine *et***

al., 1980) seguidas de una hélice- α de 3 giros y terminando en una lámina- β (**Buzzini et al., 2003**). La β -lg pertenece a la familia de las lipocalinas, que está formada por proteínas extracelulares pequeñas y que son capaces de unir ligandos hidrofóbicos (**Rapp et al., 1986**), a pesar de que la función biológica de la β -lg es incierta, ésta ha sido objeto de numerosos estudios debido a su abundancia, la facilidad para purificarla y su capacidad de unir diversos ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos, retinol, vitamina D3 y péptidos (**Bouamra et al., 2002**).

Su punto isoelectrico es de 5.2 (**Bouét et al., 2006**), tiene 162 aminoácidos con cinco cisteínas (Cys), de las que cuatro están implicadas en los enlaces disulfuro; uno de ellos une la Cys66 con la Cys160 y el otro a la Cys106 con la Cys119 (**Burger et al., 2009**). El grupo tiol libre se encuentra en la Cys121 y su existencia es muy importante para los cambios que ocurren en la leche durante el calentamiento, pues está implicado en reacciones con otras proteínas, especialmente la κ -caseína y la α -lactoalbúmina (**Carrère et al., 2006**).

La β -lactoglobulina es la principal portadora de grupos sulfhidrilo, que se modifican o descomponen en el curso de la desnaturalización por calentamiento y que intervienen en el desarrollo del sabor a cocido de la leche sobrecalentada (**Bouamra et al., 2002**). Las inmunoglobulinas son proteínas que forman parte del sistema de defensa contra microorganismos, su estructura básica en forma de Y está constituida por dos cadenas ligeras (unidas a una cadena pesada por puente disulfuro) y dos pesadas (glicosiladas)(unidas entre sí por dos puentes disulfuro) (**Gil, 2007**). La albúmina es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 528 aminoácidos, en el lactosuero se encuentra en una concentración de alrededor de 0.4 mg/mL (**Chorteris & Wichester, 2010**). La lactoferrina es una proteína fijadora de hierro, es una glicoproteína formada por dos lóbulos, unidos por una hélice de

tres vueltas, los dos lóbulos tienen un 37 % de homología de secuencia, por lo que es probable que procedan de una proteína antecesora de la mitad de tamaño (**Carrère et al., 2006; Chortheris & Wichester, 2010**).

2.1.2. Tipos de lactosuero

Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, se obtiene empleando la coagulación de la caseína por acción de la renina a pH 6.5, el segundo llamado ácido, resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (**Parra et al., 2009**), la composición química promedio de estos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del lactosuero dulce, ácido y de requesón .

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)	Lactosuero de requesón (g/L)
Sólidos totales	63.0- 70.0	63.0-70.0	61.0-69.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0	44.0-51.0
Proteína	6.0-10.0	6.0-8.0	5.8-8.9
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6	0.3-0.5
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5	0.8-2.5
Lactato	2	6.4	1.8

Fuente:Parra *et al.*, 2009

La composición de ambos tipos de suero varía fundamentalmente en el contenido de lactosa, se reporta entre 4.5 – 5.0 % para suero dulce y de 3.8 – 4.2 % para suero ácido, de acuerdo al pH, se clasifican como lactosuero dulce (pH > 5.8), lactosuero semiácido (pH 5.8-5.0) y lactosuero ácido (pH < 5.0) (**Buzzini et al., 2003**). El lactosuero dulce tiene mayor contenido de

péptidos y aminoácidos, debido a la proteólisis producida por el cuajo **(Carrasco et al., 2010)**.

2.2. Consideraciones ambientales

El poder contaminante sustancial del lactosuero, que presenta valores de DBO y DQO, 438 y 609 veces mayores, respectivamente, que los efluentes de las aguas residuales típicas, han impulsado a los gobiernos y otras autoridades reguladoras para restringir y / o prohibir el vertido del lactosuero sin tratar **(Smithers et al., 2015)**.

Entre 1960 y 1990, la producción industrial intentó minimizar el impacto por tratamiento de efluentes y la eliminación de contaminantes de un medio ambiente dañado **(Gavrilescu & Chisti, 2005)**. El diseño de procesos industriales y tecnologías que impedían la contaminación en primer lugar, no se convirtió en una prioridad hasta hace poco **(EPA, 2003; Bouët et al., 2006)**.

Se han producido avances en las tecnologías del lactosuero que han incluido procesos unitarios eficientes y rentables para la concentración, la transformación, el fraccionamiento y la deshidratación del lactosuero, junto con la introducción de las técnicas bioquímicas modernas para la fabricación de nuevos ingredientes a base de suero con una expandida base de aplicaciones para mercados cada vez más receptivos **(Foegeding et al., 2002; Pisechy et al., 2005; Durham & Hourigan, 2007)**.

2.3. Regulación y legislación ambiental

Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y los Países de la Unión Europea (principales productores de lácteos), han introducido legislaciones estrictas respecto a la protección del ambiente **(Smithers et al., 2015)**. Tal escena legislativa, ha resultado en la búsqueda de alternativas para

reciclar el lactosuero, basadas en una comprensión científica de los componentes de este residual (**Holland et al., 2010**).

Resultado de ello, tres opciones diferentes en la gestión del lactosuero pueden ser consideradas. La primera se basa en tecnologías de valorización; estas tecnologías se introducen para recuperar compuestos valiosos tales como proteínas y lactosa (**Gannoun et al., 2008**). La segunda opción se basa en la aplicación de tratamientos biológicos; mientras que la tercera opción es la aplicación de tratamientos fisicoquímicos entre los que se encuentran la coagulación-floculación, ozonización entre otros (**Gannoun et al., 2008; Foegeding et al., 2002**).

Considerando el alto valor nutricional del lactosuero (Figura 2), algunos autores han afirmado que el procesamiento de las proteínas puede utilizarse con fines terapéuticos, tales como antioxidantes y como antihipertensivos (**Vasala et al., 2005; Prazeres et al., 2012**), debido a que liberan, por hidrólisis, péptidos bioactivos que pueden desencadenar efectos fisiológicos en el cuerpo (**Souza et al., 2010**). **Madureira et al. (2010)**, describen algunos de estos efectos como: sobre el sistema nervioso, cardiovascular e inmune.

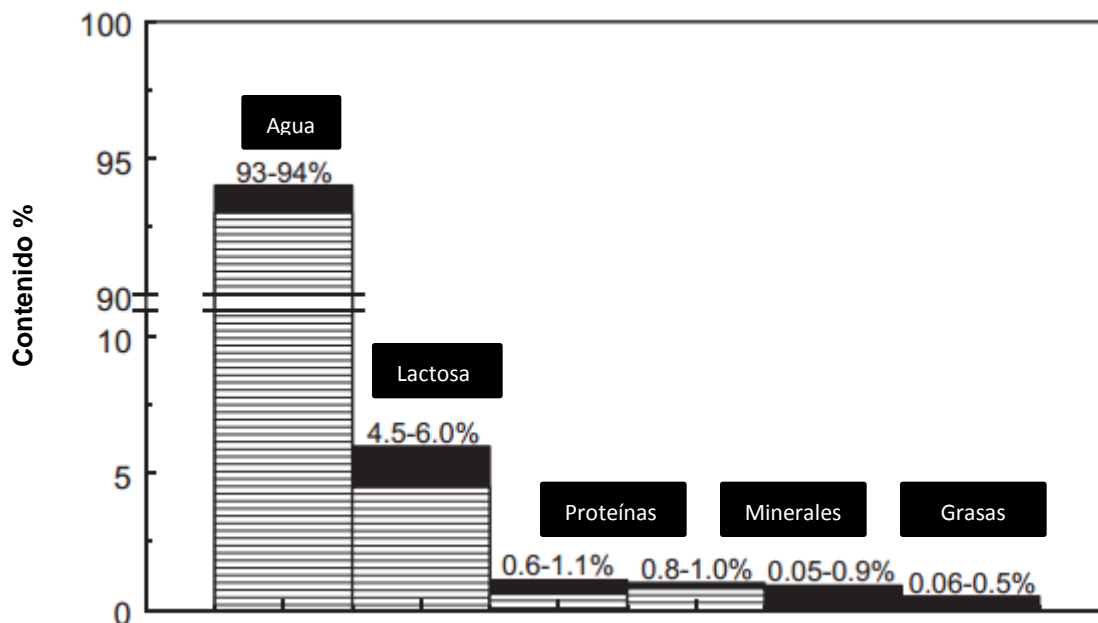


Figura 2. Componentes del lactosuero (el patrón negro representa el valor máximo). Tomado de Prazeres *et al.*, 2012.

2.4. Tratamiento del lactosuero

Sin embargo, los costos asociados a las tecnologías de valorización normalmente no son tolerables a las pequeñas y medianas fábricas, por lo que los tratamientos biológicos y/o fisicoquímicos constituyen una alternativa más viable y atractiva para este residual (Prazeres *et al.*, 2012).

2.4.1. Tratamiento biológico con valorización

La investigación sobre la digestión biológica del lactosuero comenzó en la década de 1970, con la aplicación de los procesos aeróbicos como lodos activados, filtros percoladores, lagunas de almacenamiento, etc (Holland *et al.*, 2010). Sin embargo, estos viejos procesos se limitan generalmente por la variabilidad en las propiedades de entrada de los efluentes y la carga extremadamente alta de materia orgánica, las necesidades de energía para el

suministro de oxígeno, la excesiva producción de lodos, etc (**Carvalho et al., 2013; Prazeres et al., 2012**).

Estudios realizados por **Guimaraeos et al. (2010)** mencionan, que entre estos productos se encuentra el biogás (metano), los ácidos orgánicos (ácido acético, propiónico, láctico, cítrico, glucónico, tánico, y ginerélico), los aminoácidos (glutámico, lisina, y treonina), las vitaminas (B12 y B2), los polisacáridos (goma de xantano, dextrano, pululano y gelano), los aceites, las enzimas (β -galactosidasa) y otros compuestos (difosfato de fructosa, 2,3 butanodiol, magnesio, acetato, lactato de amonio, butanol, glicerol y etanol) (Figura 3). Recientemente la biotecnología, ha abierto alternativas muy interesantes para ello, fundamentalmente porque permite la transformación de la lactosa (sólido abundante en el lactosuero con poca demanda y escaso valor), en productos de valor agregado (**Garibay et al., 2000; Souza et al., 2010**).

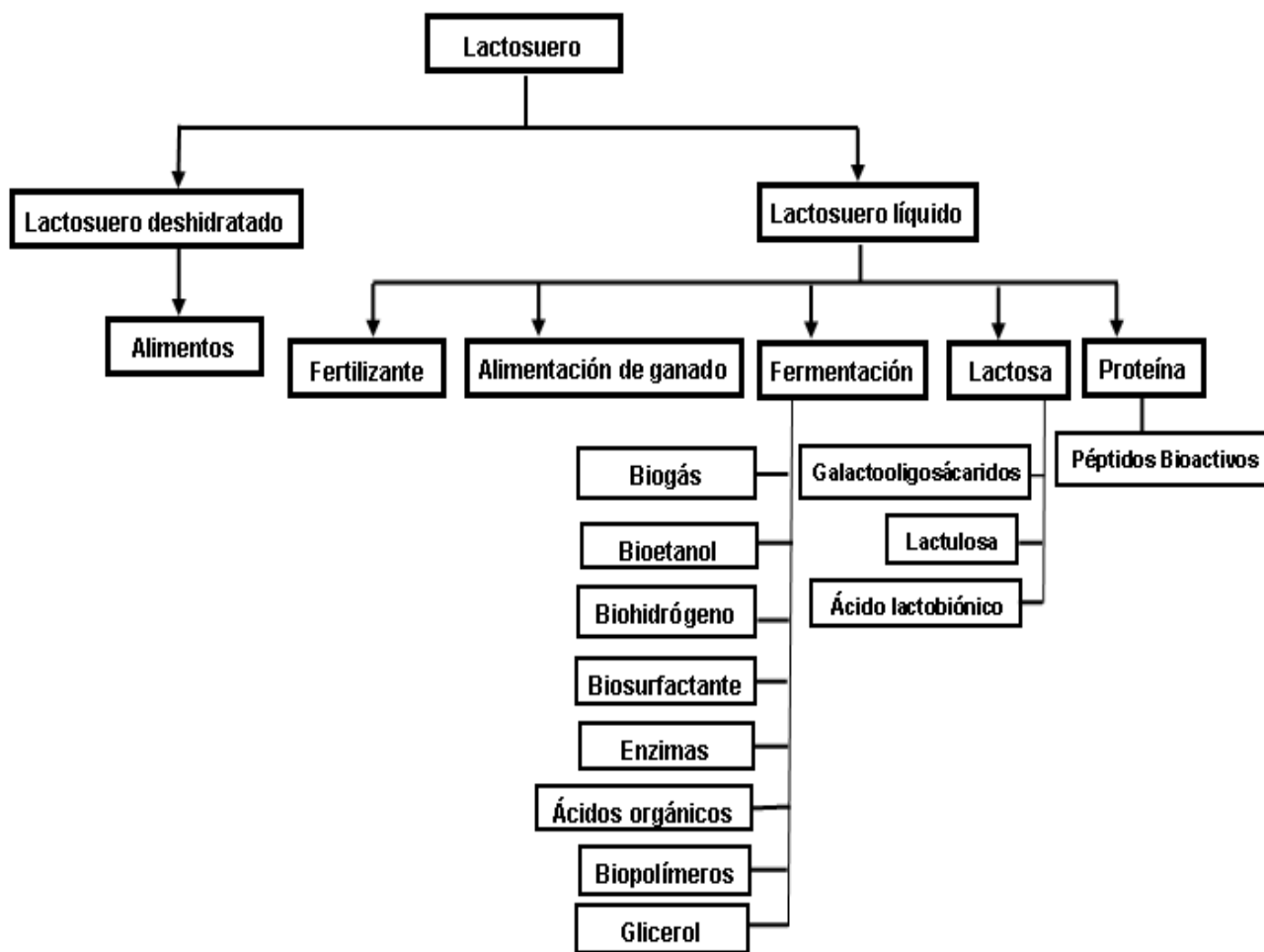


Figura 3. Subproductos del lactosero líquido y deshidratado tomado de Nath et al.,2015.

2.4.1.1. Hidrólisis de lactosa

El número de microorganismos disponibles comercialmente capaz de metabolizar glucosa y galactosa es significativamente más alto que el número de microorganismos capaces de utilizar directamente lactosa (Siso, 1996; Berruga et al., 1997). La hidrólisis de lactosa, se divide en hidrólisis química caracterizada por condiciones ácidas ($\text{pH} < 1.5$) y altas temperaturas ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$) e hidrólisis enzimática a través de la enzima β -galactosidasa (Kosaric & Asher, 1985; Guimarães et al., 2010).

2.4.1.2. Hidrólisis química

La hidrólisis química puede llevarse a cabo con adición de ácidos, tales como ácido sulfúrico o el uso de ácido sólido, como la forma de ácido de una resina de intercambio catiónico (**Gannoun et al., 2008**). La hidrólisis química tiene algunas desventajas tales como la desnaturalización de las proteínas, la necesidad de pre-desmineralización, la aparición de un color marrón debido a las reacciones de Maillard y la formación de productos indeseables (**Siso, 1996**). Como consecuencia de ello, la hidrólisis enzimática es la ruta preferencial para hidrolizar lactosa (**Kosaric & Asher, 1985**).

2.4.1.2.1. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática, se llevado a cabo por medio de la enzima lactasa (que se encuentre en los animales, plantas, bacterias, hongos y levaduras) que convierte la lactosa en sus monosacáridos, glucosa y galactosa (**Nath et al., 2015**). Las principales cepas utilizadas en este proceso son *Aspergillus* y *Kluyveromyces marxianus* (**Smithers et al., 2015**).

En *K. marxianus*, la lactosa entra en las células a través de la lactosa permeasa Lac12p y Lac4 β -galactosidasa citosólica que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa (**Kang et al., 2004**)(Figura 4). La galactosa y el ATP, interactúan alostéricamente con la primera enzima, actuando en la vía de Lelior, la galactoquinasa bifuncional, KIGa1p (**Adam et al., 2004**). Esto conduce a un cambio que facilita la interacción de esta proteína con el represor transcripcional KIGa180p (**Lee et al., 2004**). Después de la unión de la galactosa y el ATP, Gal3p sufre un cambio conformacional que le permite secuestrar monoméricamente Gal80p en el citosol (**Becerra et al., 2002**). El activador específico de la transcripción de los genes LAC/GAL KIGal4p, se libera a continuación de la inhibición, mediada por su interacción con KIGal80p (**Verstrpen et al., 2004**). KIGal4p activa la expresión de genes Lac a través de su unión como dímero (**Platt et al., 2000**).

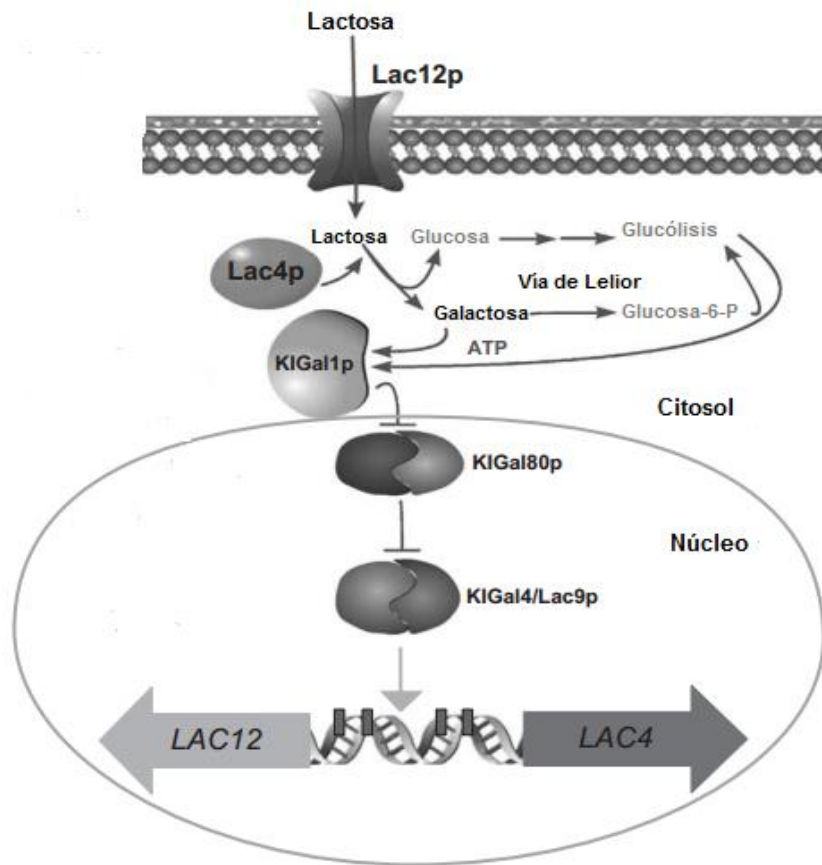


Figura 4. Modelo de regulación de la hidrólisis de lactosa en *Kluyveromyces marxianus* tomado de Teixeira et al., 2006.

2.5. *Kluyveromyces marxianus*

Esta levadura es una especie capaz de crecer a temperaturas de hasta 45 °C, sin embargo, algunos autores mencionan que la temperatura ideal de crecimiento es de 37 °C (Rouwenhorst et al., 1990). Posee una alta capacidad de conversión de sustrato en biomasa y la más alta tasa de crecimiento específico, entre los eucariotas (Nitsche et al., 2011). Fermenta galactosa, sacarosa, rafinosa, lactosa y crece a un pH que va, en un rango entre 4.5 y 7 (Padín et al., 2009). *K. marxianus* puede producir compuestos aromáticos, tales como ésteres de frutas, ácidos carboxílicos, cetonas, furanos, alcoholes, monoterpenos y acetato de isoamilo en fermentación líquida

(Graciano et al., 2008). Además del tipo de levadura, varios factores contribuyen a la producción de compuestos aromáticos. Estos incluyen temperatura, pH, aireación, agitación, naturaleza y concentración del sustrato utilizado, cantidad de agua, vitaminas y nutrientes (micro y macronutrientes), en donde se incluye a las fuentes de nitrógeno y fósforo **(Abbas, 2006; Platt et al., 2000)**.

Entre los compuestos aromáticos, se ha reportado que las especies de *K. marxianus*, presentan los mayores niveles de producción del compuesto aromático 2-FE **(Garavaglia et al., 2007; Etschmann et al., 2006; Schrader, 2006)**. Adicionalmente a ello, en contraste con otras levaduras conocidas que producen 2-FE, *K. marxianus* tiene el estado GRAS, lo que la hace adecuada como cepa a nivel industrial, es Crabtree-negativa, que es una ventaja, debido a la formación de etanol como un subproducto **(Wittmann et al., 2002)**.

La Figura 5, muestra las vías metabólicas básicas, utilizando glucosa como fuente de carbono y energía y L-fenilalanina, como precursor del producto, que se han propuesto en la producción de 2-FE por la levadura **(Wittmann et al., 2002)**. Puede observarse la vía de la glucólisis, la vía pentosa fosfato, la vía prefanato, para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, la vía de Ehrlich, para la producción de 2-feniletanol y el 2-feniletacetato, además del desglose de la vía catabólica cinamato de L-fenilalanina, carboxilación anaeróbica del piruvato, y las vías para la producción de glicerol, etanol y acetato, respectivamente.

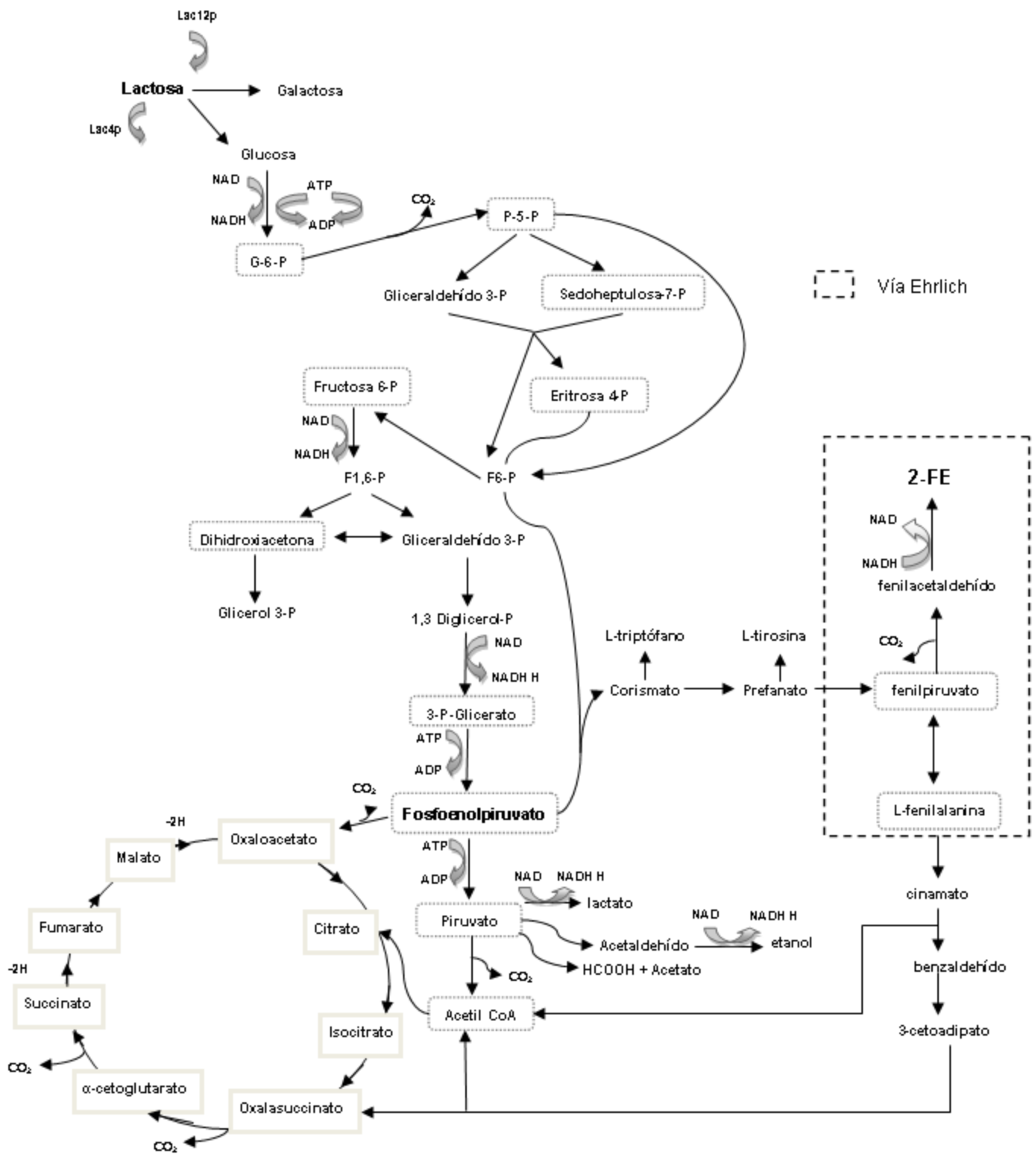


Figura 5. Rutas metabólicas de *K. marxianus* para la producción de 2-FE.

2.6. 2-feniletanol (2-FE)

El 2-feniletanol (Figura 6), es un alcohol superior (AS), clasificado como aromático. El término AS hace referencia a aquellos alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono, un peso molecular y punto de ebullición superior al del etanol (**Lambrechts & Pretorius, 2000**). 2-FE, es un compuesto con aroma a rosas de alto valor (1000 dólares/kg), cuya producción mundial asciende a 7,000 toneladas por año (**Etschmann et al., 2006**). Este compuesto es uno de los sabores más utilizados en la industria alimentaria, es muy importante para la modificación de la composición organoléptica del sabor, sobre todo en fórmulas frutales (**Garavaglia et al., 2007**).

El aroma a rosas del 2-FE, es muy utilizado en la elaboración de perfumes y cosméticos. Muchos alimentos fermentados tienen altas concentraciones de 2-FE, tales como hojas de té, cacao, café, pan, vino, sidra, cerveza y salsa de soya (**Etschmann et al., 2002**). Particularmente en las bebidas de vino y otros, 2-FE es un compuesto importante que contribuye a la calidad del sabor. Este aroma se añade también, a la composición de los helados, dulces, bebidas sin alcohol, gelatinas, pudines, gomas de mascar, entre otros (**Garavaglia et al., 2007**).

Estudios realizados por **Huang et al. (2001)**, mencionan que el crecimiento y la producción de 2-FE, se incrementan conforme aumenta la velocidad de agitación. Esto ha sido comprobado con reportes de diversos investigadores, donde la producción de alcohol por microorganismos se ve afectada por la velocidad de aireación y agitación (**Raymond et al., 1990**). Sin embargo, la agitación excesiva puede romper las células grandes e incrementar la temperatura, lo que ocasiona un descenso en la viabilidad celular (**Äyräpää, 1971**).

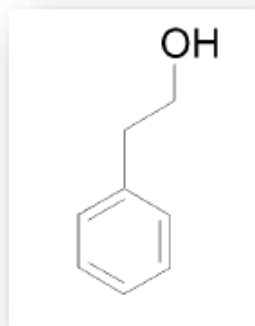


Figura 6. Estructura molecular del compuesto 2-FE.

Es considerado como repelente de mosquitos y tiene propiedades fungicidas (**Bergada, 2007**). Debido al alto costo de producción de estos aceites esenciales (alrededor de 3000 dólares/kg), comercialmente el 2-FE, es principalmente de origen sintético, derivado del benceno, cuyo costo es de alrededor de 10 dólares/kg (**Lomascolo et al., 2001**). Aunque todavía es mayoritariamente sintetizado a través de rutas petroquímicas, la demanda de 2-FE procedente de fuentes naturales es cada vez mayor. En la actualidad el 2-FE natural es principalmente extraído de los pétalos de rosa, mediante procesos muy costosos (**Fabre et al., 1998**). Sin embargo, la disponibilidad de esta fuente natural no puede afrontar la demanda de 2-FE natural (**Wittmann et al., 2002**).

2.6.1. Propiedades físicas y químicas del 2-FE

Este compuesto es denominado también como 2-alcohol fenil etílico, β -alcohol fenil etílico, alcohol fenílico, bencil carbonilo y β -hidroxi etil benceno. Su umbral de percepción es de 12 a 24 $\mu\text{g/L}$ en agua y en aire a 1000 $\mu\text{g/L}$ (**Etschmann et al., 2002**). Estudios realizados por **Vandamme y Soetaert (2002)**, mencionan que el 2-FE es perceptible a 125 ppm en solución acuosa. Este compuesto se encuentra incluido en le catalogo FEMA-GRAS, de

compuestos seguros para ser utilizados en alimentos (FEMA-GRAS: 2858) (Adams *et al.*, 2005).

Tabla 2. Propiedades del compuesto 2-FE .

Propiedades	Descripción
Peso molecular	122.2 g/mol
Punto de ebullición (101.3 KPa)	219.8°C
Densidad (20°C)	1.0202 g/cm ³
Punto de fusión	-27°C
Punto de inflamación TCC	102°C
Índice de refracción (20°C)	1.5325
Solubilidad	19 /L

2.6.2. Fuentes naturales y Uso industrial

2-FE se encuentra naturalmente en aceites esenciales de muchas flores y plantas, como jacintos, jazmines, narcisos y lirios. En la mayoría de los casos, las concentraciones son demasiado bajas para justificar su extracción (Etschmann *et al.*, 2002). Una excepción es el aceite de rosa, el cual, según la variedad, puede contener hasta un 60% de 2-FE. Altos porcentajes sólo pueden ser alcanzados con la extracción por solvente, ya que las pérdidas por destilación son muy elevadas (Bedoukian, 1986).

El 2-FE también se usa como materia prima para la producción de derivados, como el acetato feniletílico (GRAS 2857) que es un compuesto muy valioso para dar aroma y sabor (Bedoukian, 1986). 2-FE se utiliza también en la industria química, en procesos de obtención de diferentes productos como

pueden ser estireno, éster fenilacético, fenilacetaldehído, ácido benzoico y fenilacético y bifenil éter, entre otros (**Mookherjee et al., 1996**).

2.7. Síntesis bioquímica

El 2-FE es un metabolito de la fermentación microbiana, por lo tanto, la síntesis por microorganismos es una opción viable (**Etschmann et al., 2003**). Aunque los microorganismos, especialmente las levaduras, son capaces de producir 2-FE por el metabolismo normal (**Garavaglia et al., 2007**), la concentración final de 2-FE en el caldo de cultivo de cepas seleccionadas, generalmente sigue siendo muy baja (**Janssens et al., 1988; Fabre et al., 1996**). Sin embargo, la producción de 2-FE por microorganismos puede incrementarse mediante la adición del aminoácido L- fenilalanina al medio, por lo que es importante saber el destino de los precursores y su papel en la bioconversión (**Etschmann et al., 2002; Large, 1986**).

2.7.1. Ruta de Ehrlich

La bioconversión a partir de L-fenilalanina, se da a través de la ruta de Ehrlich (**Stark et al., 2002**). Ésta ruta, comúnmente aceptada, de la L-fenilalanina a 2-FE (Figure 7), parte de una reacción de transaminación, en la cual, se libera un amonio que se condensa con α -cetoglutarato, formando glutamato (**Stark et al., 2003**). La L-fenilalanina es transaminada, formando fenilpiruvato, el cual es descarboxilado a fenilacetaldehído y finalmente, reducido a 2-feniletanol (**Etschmann et al., 2002**). La etapa de reducción es catalizada por una enzima alcohol deshidrogenasa (**Serpe et al., 2003**). A través de la adición de L-fenilalanina al medio de cultivo, la ruta de Ehrlich es acelerada y se pueden producir altas concentraciones de 2-FE (**Etschmann et al., 2003**).

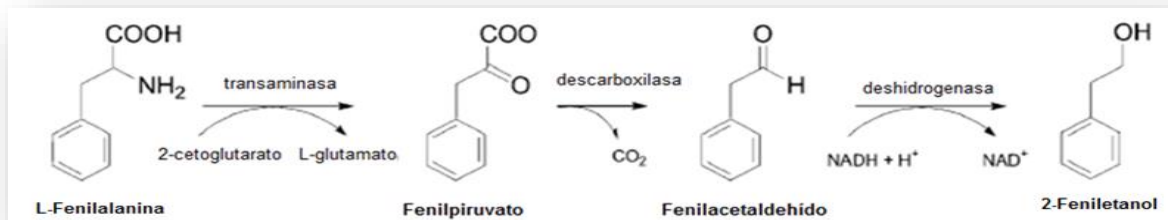


Figura 7. Ruta de Ehrlich para la síntesis de 2-FE.

2.7.2. Vía fenilpiruvato

El 2-FE se puede producir, también por la síntesis de *novo*, a través de la vía del siquimato (Figura 8), en donde, la eritrosa 3-fosfato y el fosfoenolpiruvato de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato, se condensan, con corismato y prefenato, como productos intermedios, que conducen a fenilpiruvato eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato (Etschmann *et al.*, 2002). A partir del fenilpiruvato, puede haber una transaminación con glutamato, que actúa como donador de los grupos amino, formándose L-fenilalanina (Nelson & Cox, 2001). Entonces, el fenilpiruvato sigue normalmente la ruta de Ehrlich, es descarboxilado y reducido a 2-FE.

Sin embargo, grandes cantidades de L-fenilalanina pueden producir una inhibición retroactiva sobre las enzimas DAHP sintasa y prefenato deshidratasa, inhibiendo la síntesis de *novo*. Por otro lado, si pequeñas cantidades de L-fenilalanina son añadidas al medio, esta ruta es activada, formando bajas cantidades de 2-FE, dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula (Garavaglia, 2007).

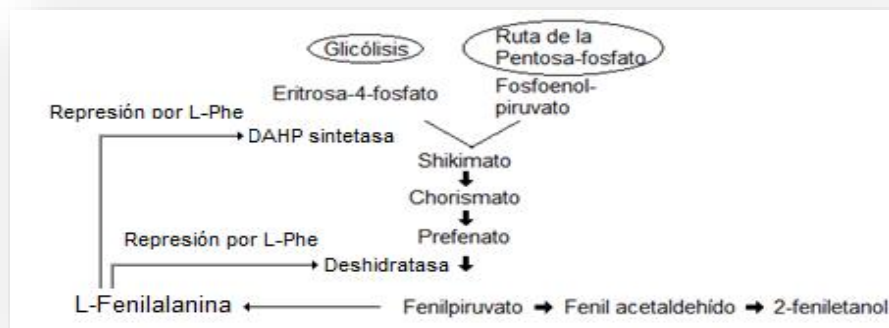


Figura 8. Metabolismo de la L-fenilalanina por la vía fenilpiruvato.

La opción utilizada para la síntesis de 2-FE, depende de la fuente de nitrógeno en el medio. Si solo los aminoácidos representan la única fuente de nitrógeno, entonces la ruta de Ehrlich predomina (**Äyräpää, 1965**). Si se encuentran disponibles otras fuentes de nitrógeno, más fácilmente digeribles, los aminoácidos serán metabolizados mediante la ruta del cinamato (**Akita et al., 1990**).

2.8. Detección de 2-FE

La mayoría de los reportes sobre la producción de 2-FE en fermentaciones, muestran los resultados de la detección del compuesto utilizando técnicas analíticas como, cromatografía de gases. Adicionalmente a ello, en este trabajo se realizó la detección y cuantificación, tanto por cromatografía de gases (CG/FID), como por resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$).

2.8.1. Cromatografía de gases

En cromatografía de gases (Figura 9), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, esto implica que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable (**Schneider et al., 2014**). La

elución se produce por el flujo de un gas inerte, como He, N₂, H₂, aunque de acuerdo con el tipo de detector, es necesario emplear gases específicos (Barqueros, 2006). Los componentes separados, emergen de la columna a intervalos discretos y pasan a través de algún sistema de detección adecuado.

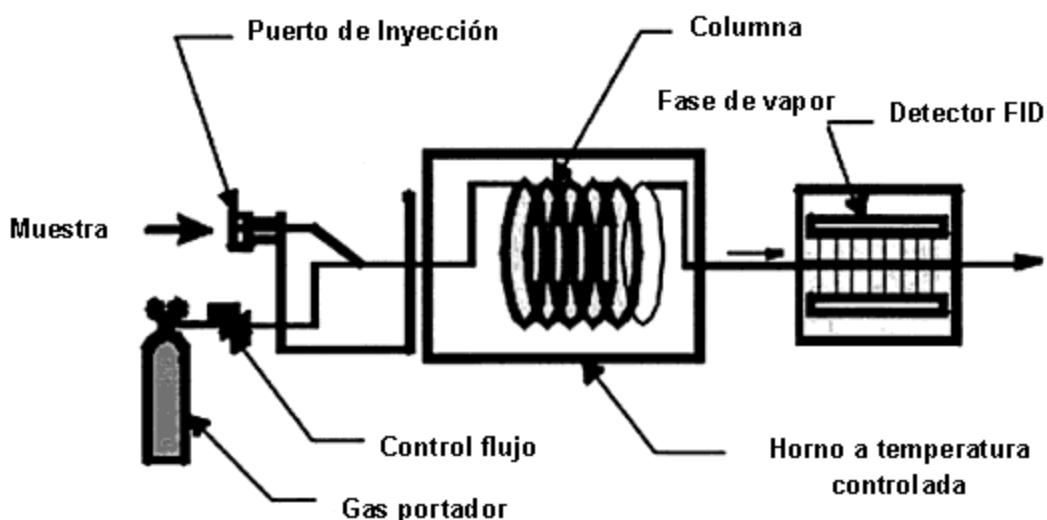


Figura 9. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases tomado de Barqueros, 2006.

2.9. Método de determinación estructural para 2-FE y lactosa

Los reportes de la composición anomérica amorfa de lactosa son escasos, con un rango de composición variable (entre 0% y 60 % p/p del contenido de β) (Jawad *et al.*, 2012). La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), es la técnica que puede proporcionar detalles más sutiles de la estructura molecular, como son ángulos de enlace o densidades electrónicas (McSweeney, 2009). El nombre de RMN deriva del hecho de que este tipo de espectroscopia, supone un cambio energético de los núcleos atómicos y de que es necesario un campo magnético para que estas variaciones de energía puedan observarse (Aulton, 2007). La energía de cada fotón de la radiación, debe corresponder exactamente a la diferencia de

energía, entre dos orientaciones distintas de los núcleos en el campo externo **(Stree,1991)**.

2.9.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

El funcionamiento de un espectrómetro básico de RMN, consiste en disolver una muestra en un disolvente adecuado (que por lo general es deuterocloroformo, CDCl_3 , que no contiene hidrógenos) y colocarlo en un tubo de vidrio delgado, entre los polos de un imán **(McMurray, 2004)**. El campo magnético intenso hace que se alineen los núcleos ^1H y ^{13}C en la molécula, en una de las dos orientaciones posibles, y a continuación se irradia la muestra con una energía de radiofrecuencia **(Aulton, 2007)**. Si la frecuencia de esta irradiación se mantiene constante y se hace variar la intensidad del campo magnético aplicado, cada núcleo entra en resonancia en una intensidad de campo ligeramente diferente. Un detector sensible monitorea la absorción de energía de rf, a continuación se amplifica la señal electrónica y se muestra en forma de un pico en una gráfica **(McMurray, 2004)**.

2.9.2. Polarimetría

En éste trabajo se determinó la rotación óptica de los tres tipos de lactosuero (LD, LA y LR), utilizando la técnica de polarimetría (Figuras 10 y 11). Las moléculas se clasifican como dextrógiras (del griego: dexter, derecha) o levógiras (del griego: laevus, izquierda) según roten en el plano de luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario. Estos puede determinarse mediante un instrumento conocido como polarímetro **(Voet, 2006)**.

Las moléculas dextrógiras y levógiras reciben valores positivos y negativos. Por eso, las primeras se designa con el prefijo (+) y sus entantiómeros levógiros mediante el prefijo (-) **(Voet, 2006)**. La polarimetría consiste en la medida de la actividad óptica a una sola longitud de onda

(generalmente a 589 nm, la línea D de la lámpara de sodio) **(Eugene, 1990)**. Ésta técnica puede proporcionar información sobre la geometría de las estructuras moleculares **(Hough *et al.*, 2007)**.



Figura 10. Polarímetro del equipo PE631136 micro cell utilizado en este trabajo.

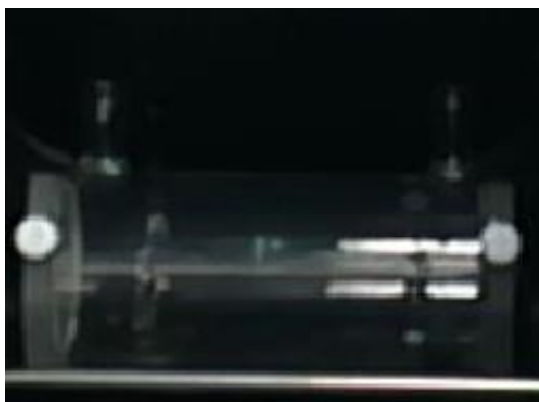


Figura 11. Celda polarimétrica del equipo PE631136 micro cell utilizado en este trabajo.



JUSTIFICACIÓN



A pesar de la riqueza nutricional, potencialmente utilizable del lactosuero, un poco más de la mitad de lo que es obtenido en la industria quesera del estado de Hidalgo, se descarga al ambiente sin ningún tratamiento, llegando a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación. Debido a esto, los sistemas biológicos son una alternativa que puede permitir la utilización este subproducto antes de desecharlo y obtener aditivos naturales. Entre éstos, el compuesto con aroma a rosas 2-feniletanol (2-FE), es una alternativa; producido a través de la hidrólisis de lactosa presente en el lactosuero, con la enzima intracelular β -galactosidasa de *K. marxianus*, dando así un valor agregado a este residual.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Producir 2-FE a partir de lactosuero como un tratamiento alternativo a la contaminación ambiental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar la producción de 2-FE en fermentaciones de lactosuero dulce (LD), lactosuero ácido (LA) y lactosuero de requesón (LR) con *Kluyveromyces marxianus*.
- II. Evaluar el efecto de la concentración de L-fenilalanina sobre la producción de 2-FE en fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus*.
- III. Evaluar el efecto de la concentración de sulfato de amonio y L-fenilalanina sobre la producción de 2-FE, en fermentaciones de lactosuero con *K. marxianus*.
- IV. Evaluar la reducción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en los tratamientos.



V. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se muestran los materiales y metodologías aplicadas para el desarrollo de este trabajo. En la Figura 12 se muestra el procedimiento experimental general propuesto.

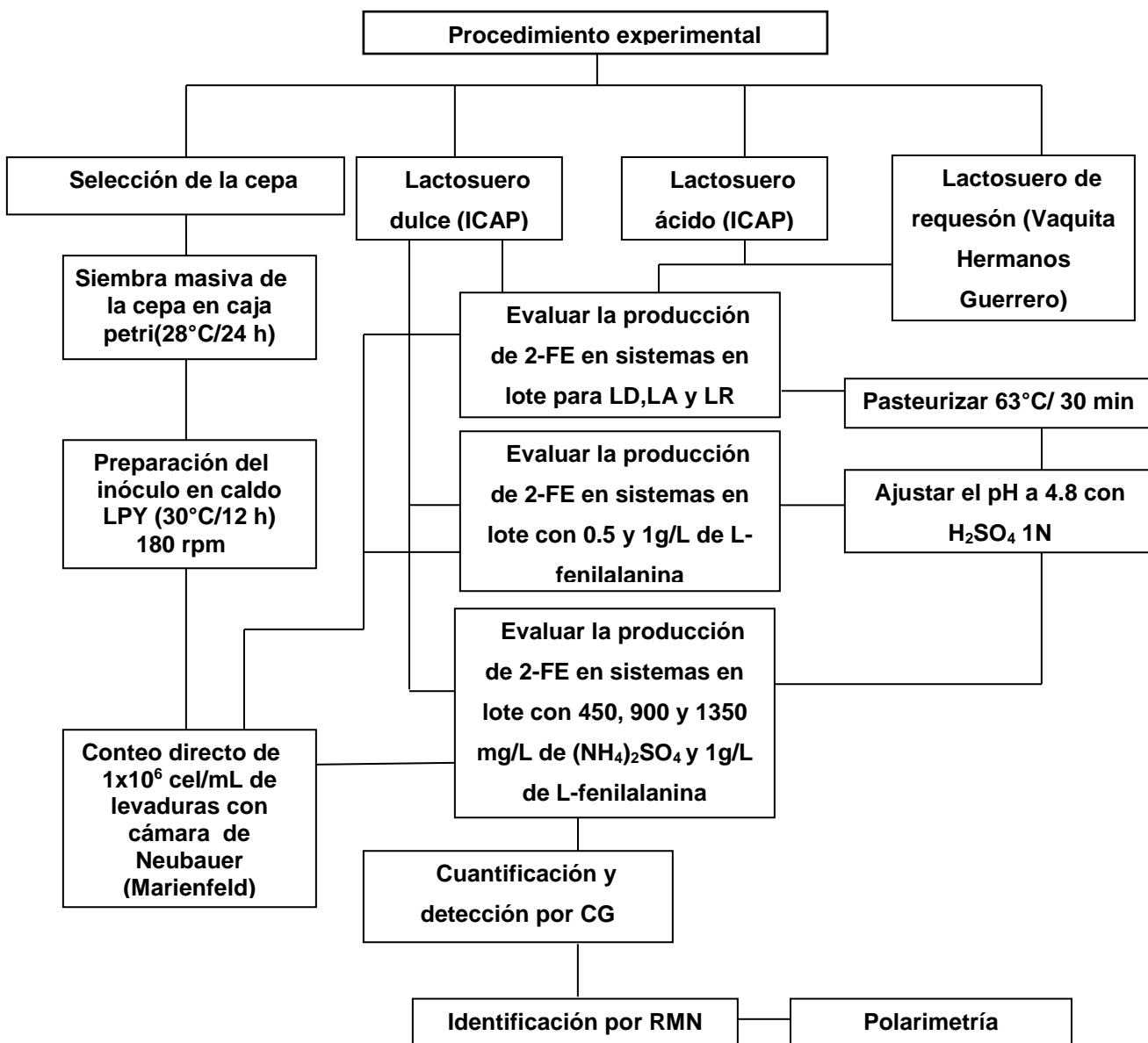


Figura 122. Metodología para las fermentaciones de lactosuero dulce, ácido y de requesón seguida en este trabajo.

5.1. Selección de la cepa

Se evaluaron tres cepas (*K. marxianus* ITD00089-ITD00090-ITD00262), aisladas por **Páez (2009)**, del proceso de fermentación alcohólica de *Agave Duranguensis*, durante la producción de mezcal, en el Estado de Durango. Se utilizó medio LPY [80 g/L de lactosa (Hycel, México), 40 g/L de peptona de caseína (Bioxon, México), 20 g/L de extracto de levadura (Bioxon, México) a pH 4.8. Se evaluó el consumo de lactosa por HPLC, como se describe en el apartado 5.7.1.]

El mantenimiento de la cepa se realizó en placas con medio LPY [20 g/L de lactosa (Hycel, México), 20 g/L de peptona de caseína (Bioxon, México), 10 g/L de extracto de levadura (Bioxon, México) y 20 g/L de Agar (Hycel, México)] a 4 °C, hasta su uso.

5.2. Sustrato

5.2.1. Lactosuero dulce (LD) y Lactosuero ácido (LA)

El lactosuero dulce (LD1) utilizado para la selección de la cepa fue producto de la elaboración del queso tipo Chihuahua. Mientras que el lactosuero dulce (LD) y lactosuero ácido (LA), utilizados para los tratamientos, se obtuvieron de la elaboración del queso tipo Panela y queso Oaxaca, respectivamente. Ambos lactosueros (LD y LA), fueron proporcionados por la productora de lácteos PROUNILAC del estado de Hidalgo (Tulancingo, Hidalgo). El suero se tomó directamente de la línea de producción del queso; éste se colocó en contenedores de polietileno de 4 L, fue transportado en contenedores con hielo hasta el laboratorio y se almacenó a 4 °C, hasta su uso.

5.2.2. Lactosuero de requesón (LR)

El lactosuero de requesón (LR) se obtuvo de la industria quesera Vaquita Hermanos Guerrero, S.A. de C.V. ubicada en Acatlán, Hidalgo. El muestreo se realizó como se mencionó en el apartado 5.2.1¹.

5.3. Análisis bromatológico del sustrato

Para el lactosuero dulce (LD1), se cuantificó la cantidad de grasa, proteínas y nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), de acuerdo a los procedimientos de la AOAC (1990). Utilizando los métodos Gerber (AOAC 33.2.27 A), Kjeldahl (AOAC 930.52) y la técnica del formol, para los análisis mencionados previamente. El pH se determinó de acuerdo a la norma NMX-F-317-S-1978.

Mientras que la caracterización de los tres tipos de lactosuero del Estado de Hidalgo (LD, LA y LR) utilizados en los tratamientos para la producción de 2-FE, se realizó en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH-ICAP). Se determinó el contenido de grasa, proteínas y minerales por la técnica espectrofotométrica utilizando el equipo Lactoscan MCC (Milkotronic Ltd, Bulgaria).

5.4. Acondicionamiento del lactosuero

Todos los lactosueros (LD1, LD, LA y LR) se pasteurizaron a 63 °C/30 min. Posteriormente, se realizó el ajuste de pH a 4.8 con H₂SO₄ 1N.

Se plantearon seis tratamientos para evaluar los tipos de lactosuero (LD, LA y LR), sobre la producción del metabolito (Tabla 3).

Tabla 3. Seis formulaciones analizadas de lactosuero a pH 4.8, 180 rpm / 30°C y conteniendo o no distintas concentraciones de (NH₄)₂SO₄ y L-fenilalanina.

Formulación de lactosuero	Tipo de lactosuero	Sulfato de amonio (mg/L)	L-fenilalanina (mg/L)
Formulación 1	LD/LA/LR	0	0
Formulación 2	LD	0	500
Formulación 3	LD	0	1000
Formulación 4	LD	450	1000
Formulación 5	LD	900	1000
Formulación 6	LD	1350	1000

5.5. Producción de 2-feniletanol (2-FE)

La cepa de *K. marxianus* se sembró en placa de petri con medio LPY y se incubó a 28 °C/24 h (Arsa, México). Una asada del cultivo fue transferida a un matraz Erlenmeyer conteniendo 100 mL de caldo LPY a pH de 4.8. El matraz se incubó en agitación (120 rpm, Shaker Thermo Scientific) durante 12 h a 28 °C. Posteriormente, se adicionó un inóculo inicial de 1x10⁶ células/mL, utilizando la técnica de conteo directo al microscopio con cámara de Neubauer (Marienfeld); éste inóculo fue adicionado a matraces conteniendo lactosuero a pH de 4.8, los matraces se incubaron en agitación (180 rpm) a 30 °C por 96 h. Cada 24 h se tomaron alícuotas de 1 mL de cada matraz, se colocaron en tubos estériles de plástico (Eppendorf, México) y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis por cromatografía de gases, para detectar la producción de 2-FE. Este procedimiento se realizó para los tres tipos de lactosuero (LD, LA y LR). Bajo los tratamientos previamente descritos.

5.6. Conteo de levaduras

Periódicamente, a partir de cada matraz, se efectuó un recuento de las levaduras, mediante la técnica de conteo directo al microscopio, utilizando una cámara de Neubauer (Marienfeld).

5.7. Métodos analíticos

5.7.1. Cromatografía de gases (CG)

Para la detección y cuantificación de 2-FE en las muestras de lactosuero fermentado, los tubos estériles de plástico (Eppendorf, México) que contenían 1 mL de las muestras de lactosuero, fueron centrifugados a 6000 rpm/3 min. Se retiró el sobrenadante y éste se filtró con membranas de celulosa, con un diámetro de poro de 0.5 μm ; el filtrado se analizó directamente por cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer N931-6403 (Norwalk, USA), equipado con un detector FID, provisto de una columna DB WAX J&W Scientifics (60 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 y 300 °C, respectivamente. La temperatura del horno se incrementó de 35 a 210 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min durante 4 min. Se utilizó nitrógeno como gas portador, a un flujo de 1 mL/min, para todas las muestras. Los compuestos se identificaron y se cuantificaron por comparación con patrones. La inyección de las muestras se realizó por duplicado.

5.7.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Por otro lado, también a partir de las muestras filtradas, se cuantificó la concentración de lactosa y etanol solo para el LD1 (Estado de Durango) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) AGILENT® 1100, provisto de un inyector automático con un detector de índice de refracción,

equipado con una columna SEPAX Carbomix H-NP10:8% (7.8 x 300 mm), con un flujo de 0.4 mL/min.

5.7.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Para la determinación estructural del compuesto 2-FE, las muestras de lactosuero fermentadas, contenidas en los tubos estériles de plástico (Eppendorf, México), fueron centrifugadas a 6000 rpm/6 min. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a 60 °C/30 min, hasta evaporar el exceso de humedad. Las muestras fueron disueltas en 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (Varian NMR, 400 MHz).

5.7.4. Rotación óptica

La rotación óptica de la lactosa presente en los tres tipos de lactosuero, se determinó con un polarímetro Perkin Elmer 341, usando una lámpara de sodio con una radiación monocromática ($\lambda = 589$) y una celda de 1 dm de longitud. Para preparar las muestras, se tomaron 40 mL de cada tipo de lactosuero (LD, LA y LR) en tubos cónicos de propileno estériles de 50 mL y fueron centrifugados a 6000 rpm/10 min. El remanente se colocó en un matraz bola de 250 mL y se evaporó en un rotavapor BÜCHI Waterbath B-480 a 80 °C, utilizando una rotación media. La rotación específica se calculó de la siguiente manera:

$$[\alpha_{obs}]_D = \frac{100^\circ \alpha}{l \cdot C}$$

Donde:

α = Rotación óptica

D = radiación monocromática de sodio ($\lambda = 589\text{nm}$)

l = *dm* largo

C = concentración en g/100mL

5.7.5. Colorimetría de reflujo cerrado

La DQO es una medida del oxígeno requerido para oxidar todos los compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, presentes en agua contaminada, se realiza a través de la acción de agentes fuertemente oxidantes y un medio ácido. Para la determinación, se utilizó la técnica de digestión por reflujo cerrado (**APHA, 2005**). Las muestras de lactosuero fermentadas, se centrifugaron a 6000 rpm/10 min. El sobrenadante se microfiltró con membranas de celulosa de 0.5 µm de diámetro de poro. Posteriormente, se le adicionó 1 mL de dicromato de potasio con ácido sulfúrico y 1.5 mL de sulfato de plata, se colocaron en un parrilla de digestión durante 2 h/150 °C. La determinación de la absorbancia, fue colorimétrica a una longitud de onda de 620 nm. La DQO se midió cada 24 h durante 4 días en los sistemas en lote para cada tipo de lactosuero (LD, LA y LR) y en cada tratamiento.

5.7.6. Determinación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para determinar el contenido de lactosa en los lactosuero del Estado de Hidalgo (LD, LA y LR), contenidas en tubos estériles, éstas fueron centrifugadas a 6000 rpm/3 min. Posteriormente, 100 µL fueron adicionados en tubos de 25 mL estériles que contenían 1.5 mL de DNS de acuerdo a lo reportado por **Hortch et al. (2008)**. Los tubos se mantuvieron en agua a 100 °C/ 5 min. La lactosa reduce uno de los dos grupos nitro, que conduce a cambios de color de amarillo a marrón, que a su vez se cuantificó fotométricamente a 540 nm (calibración con agua con una persiana y con solución de lactosa como estándar 4 g/L). Ver Tabla 4.

Tabla 4. Composición del método modificado de DNS.

Composición de la solución		
Reactivos	g	mL
ácido 3,5-dinitrosalicílico	10.6	
NaOH	19.8	
Agua		1416
tartrato de NaK	306	

5.8. Modelos matemáticos

5.8.1. Gompertz, Logístico y Richards

En este trabajo se realizó la cuenta directa de levaduras al microscopio con cámara de Neubaur. El conteo se realizó cada 24 h durante 4 días, para cada cinética de fermentación, en los tres tipos de lactosuero (LD, LA y LR), como se mencionó en el apartado 4.13. Los datos experimentales se ajustaron de manera independiente en las ecuaciones matemáticas de Gompertz, Logístico y Richards, por regresión no lineal de acuerdo a **Zwietering et al. (1990)**, con el algoritmo de Marquardt. Ver Tabla 5.

Tabla 5. Solución de la ecuación de Gompertz, Logístico y de Richards expresada en términos de A, μ_m y λ .

Modelos	Ecuación	Solución de la ecuación en función de A, μ_m y λ
Gompertz	$y = a \cdot \exp[-\exp(b - cx)]$	$y = A \cdot \exp \left\{ -\exp \left\{ \frac{\mu_m \cdot e}{A} \right\} (\lambda - x) + 1 \right\}$
Logístico	$y = \frac{a}{[1 + \exp(b - cx)]}$	$y = \frac{A}{[1 + \exp \left\{ \frac{4\mu_m}{A} \right\} (\lambda - x) + 2]}$
Richards	$y = a \{ 1 + b \cdot \exp[k(c - x)] \}^{-\frac{1}{b}}$	$y = A \left\{ 1 + b \cdot \exp \left[(1 + b)^{\left(1 + \frac{1}{b}\right)} \cdot (\lambda - x) \right] \right\}^{\left(\frac{-1}{b}\right)}$

a, b y c son parámetros matemáticos que describen la curva sigmoideal y e=2.718

La obtención de los valores de las constantes a , x_c y k , se realizó con ayuda del programa OriginPro versión 8.1, usando el método de mínimos cuadrados, con un intervalo de confianza de 95 %. Una vez calculados los valores de a , x_c y k , como solución al modelo aplicado, se obtuvieron los valores de A , μ_m y λ , mediante la ecuación correspondiente con su solución (Tabla 5). El tiempo de generación (t_g), se calculó de acuerdo a **Dalgaard et al. (1994)**, de la siguiente manera:

$$t_g = \text{Log}_{10}(2) / \mu_m$$

5.8.2. Monod

Los parámetros cinéticos (μ , $Y_{x(\text{biomasa})/s(\text{lactosa})}$, $Y_{p(2\text{-FE})/s(\text{lactosa})}$, r_p , r_g , $-r_s$ y K_{obs}), se determinaron utilizando las ecuaciones matemáticas del modelo de Monod, de acuerdo a **Scott (2008)**.

Los experimentos se llevaron a cabo en lote (batch, reactor intermitente), midiendo la concentración tanto de producto (2-FE), como de sustrato (lactosuero), en función del tiempo. El análisis se realizó mediante el método diferencial, considerando una reacción isotérmica de volumen constante.

Se realizó un balance molar para reacciones múltiples, considerando la concentración del líquido en un reactor intermitente de la siguiente manera:

$$\frac{dC_A}{dt} = r_A$$

Para este sistema, en donde se ha reportado que el producto puede ser inhibitorio (2-FE), respecto a la velocidad de crecimiento (r_p). Se utilizó la ecuación de Monod para inhibición por producto, que es descrita de la siguiente manera:

$$r_g = k_{obs} \frac{\mu_m C_s C_x}{K_s + C_s}$$

$$k_{obs} = \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^n$$

Donde :

$\mu_m =$ *velocidad de reacción específica de crecimiento máxima, s⁻¹*

$K_s =$ *constante de Monod, g / dm³*

$C_s =$ *concentración de sustrato, g / dm³*

$C_x =$ *concentración de células, g / dm³*

$n =$ *constante química*

$C_p^* =$ *concentración de producto en la cual el metabolismo cesa, g / dm³*

$K_{obs} =$ *constante*

El coeficiente de rendimiento estequiométrico, $Y_{p/s}$, que relaciona la cantidad de producto formado por masa de sustrato consumido, se calculó de la siguiente manera:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{masa de producto formado}}{\text{masa de sustrato consumido}}$$

La relación de las nuevas células formadas y el sustrato consumido, que se relaciona directamente con el rendimiento, se calculó de la siguiente manera:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{masa de nuevas células formadas}}{\text{masa de sustrato consumido}}$$

La velocidad de consumo de sustrato (-rs), se calculó de la siguiente manera:

$$-rs = Y_{s/x} rg + mC_c$$

Donde:

$Y_{s/x} =$ *coeficiente estequiométrico para células y sustrato*

$rg =$ *velocidad de crecimiento de la célula, g / dm³ · s*

$mC_c =$ *Velocidad para mantenimiento celular*

El sustrato consumido se agrupa en el coeficiente estequiométrico $Y_{s/x}$. El crecimiento exponencial (rg), se calculó de acuerdo a la ecuación de Monod de la siguiente manera:

$$rg = \mu C_c$$

La velocidad de formación de producto (rp) para 2-FE, asociado con el crecimiento en la fase de crecimiento, se calculó de la siguiente manera:

$$rp = rgY_{p/c}$$

5.9. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), por comparación de medias por LSD (desviación de mínimos cuadrados), con un nivel de confianza del 95 %, utilizando el software STATISTICA versión 8.0.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis bromatológico del sustrato (LD1, LD, LA y LR)

Los resultados del análisis bromatológico del lactosuero dulce (LD1), utilizado en las fermentaciones para la selección de la cepa, se muestran en la Tabla 6. La concentración de lactosa y valores de pH para este lactosuero concuerdan con los reportados por **Parra et al. (2009)** y **Hadiyanto et al. (2014)**. No obstante, el LD presentó un contenido de proteína de 0.71 %, el cual difiere de lo reportado por **Araujo et al. (2007)**, quienes obtuvieron un contenido de proteína de 0.57%, esto podría deberse al tipo de leche utilizada y a las condiciones en el proceso de elaboración del queso.

Tabla 6. Valores de diferentes parámetros en el LD utilizado en las fermentaciones de la selección de la cepa .

	Lactosa (g/L)	Proteína (%)	NFA* (mg/L)	Grasa (%)	pH
Resultados	48.29±0.7	0.71 ± 0.01	169.5 ± 6.92	0.87 ± 0.05	6.28 ± 0.02

*nitrógeno fácilmente asimilable

Los resultados del análisis bromatológico de los tres tipos de lactosuero (LD, LA y LR), utilizados en las fermentaciones para los tratamientos en la producción de 2-FE se presentan en la Tabla 7. Respecto al contenido de proteína presente en el lactosuero, se ha reportado que fluctúa de 0.2 a 1.1% (**Spreer, 1991; Paneser et al., 2007**), estos resultados concuerdan con lo reportado para los tres tipos de lactosuero utilizados en esta investigación.

Tabla 7. Análisis bromatológico del lactosuero dulce, ácido y de requesón.

Tipo de lactosuero	Proteína (%)	Minerales (%)	Grasa (%)	pH
Lactosuero dulce (LD)	0.80 ± 0.10	0.59 ± 0.03	0.3 ± 0.05	5.9 ± 0.02
Lactosuero ácido (LA)	0.91 ± 0.09	0.50 ± 0.03	0.5 ± 0.03	5.2 ± 0.03
Lactosuero de requesón (LR)	1.1 ± 0.14	0.46 ± 0.03	0.1 ± 0.03	5.5 ± 0.03

El LD producido por coagulación enzimática, se ha reportado tiene un alto contenido de lactosa libre y una baja acidez, con un pH cerca de 6, lo que concuerda para este tipo de lactosuero (pH 5.9) (**Spreer, 1991; Parra et al., 2009; Hadiyanto et al., 2014**). Por el contrario, el LA (a partir del queso tipo Oaxaca), en donde el ácido láctico, que se añade o que se genera por actividad microbiana, hace que el complejo caseína se disocie del calcio, la formación de lactato de calcio es superior en éste tipo de lactosuero (~ 6.4 g/L), con un pH final cerca de 5.3, estos resultados son similares a los obtenidos para el LA [Tabla 8] (**Jelen, 2003; Franco, 2003**).

Para el LR, donde el tipo de coagulación es mixta, los microorganismos ácido-lácticos consumen la lactosa de la leche, para producir los metabolitos responsables de la textura y olor, el valor de pH no tiene un rango específico, sin embargo, los valores reportados son cercanos a los del LD (5.5 – 6.1) (**Rodríguez et al., 2010**). Bajo esta premisa, los valores obtenidos para LR concuerdan con lo reportado (Tabla 7). **Geoffrey et al. (2008)**, reportaron que el contenido en grasas para el lactosuero es de 0.1 %, mientras que el contenido de minerales es de 0.46 % (**Rektar et al., 2004; Yorgun et al., 2008**), estos resultados difieren tanto para LD como para LA, lo que se debe principalmente, a las condiciones en el proceso de elaboración de este tipo de quesos.

6.2. Selección de la cepa

El consumo de lactosa, en caldo LPY formulado con 80 g/L de lactosa, para las cepas ITD00089, ITD00090 e ITD00262 se muestra en la Tabla 5. La cepa ITD00262 consumió 80 % de la lactosa a las 96 h (Figura 13), presentando un consumo superior comparado con las otras dos cepas. Para la cepa ITD00089, el consumo de lactosa fue lento, con un consumo del 35% a las 96 h. Mientras que para la cepa ITD00090, no hubo un consumo significativo de lactosa en el tiempo estudiado (Tabla 8).

Tabla 8. Consumo de lactosa y producción de etanol de fermentaciones en caldo LPY a 120 rpm/ 96 h.

Cepa	Lactosa consumida (%)	Etanol (g/L)
ITD00089	6	1.375
ITD00090	35	11.056
ITD00262	80	25.073

Además del consumo de lactosa, el conocido efecto Crabtree de la levadura *K. marxianus*, permitió la producción de etanol con una concentración de 25.07 g/L a las 96 h para la cepa ITD00262. Mientras que para las cepas ITD00089 e ITD00090 fue de 6 y 35%, respectivamente. La importancia de la cuantificación de la concentración de etanol se consideró, para evaluar el efecto sinérgico inhibitorio entre éste metabolito y el compuesto 2-FE. Pero además, para evaluar si el etanol favorece la producción de 2-FE por la vía que envuelve el glioxilato, como se ha reportado previamente (**Wittmann et al., 2002**).

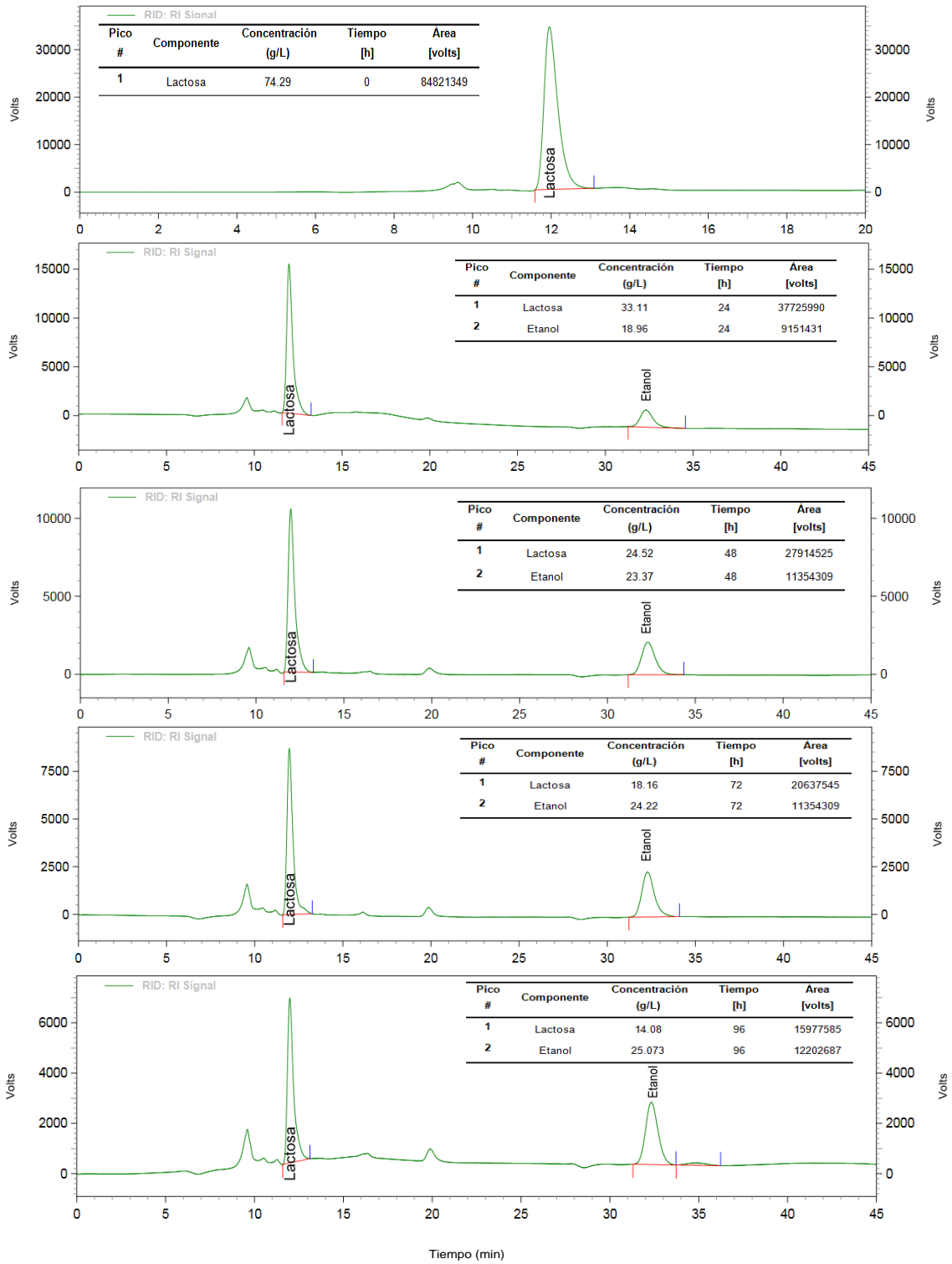


Figura 133. Cromatogramas (HPLC) de la concentración de lactosa y etanol en cinéticas de medio LPY para la cepa ITD00262.

Bajo esta premisa, se evaluó el uso del lactosuero para producir 2-FE. Las cinéticas se realizaron en lactosuero dulce (LD1) de una productora de lácteos del Estado de Durango. Se observó que *K. marxianus* ITD00262 fue capaz de producir 2-FE (134 mg/L), utilizando como sustrato LD1 (Tabla 6). Además, se observó un incremento en la concentración de *K. marxianus* ITD00262 (1.80×10^9 UFC/mL) y una clara reducción en la concentración de lactosa (1.02 %) durante la producción del 2-FE (Tabla 9). La máxima concentración de 2-FE obtenida fue de 134.55 mg/L a las 24 h de incubación (Figura 14). El cromatograma para el compuesto 2-FE muestra una señal a un tiempo de retención de 18.11 min, con un área bajo la curva de 21.05 pascal-segundo (pa s^{-1}).

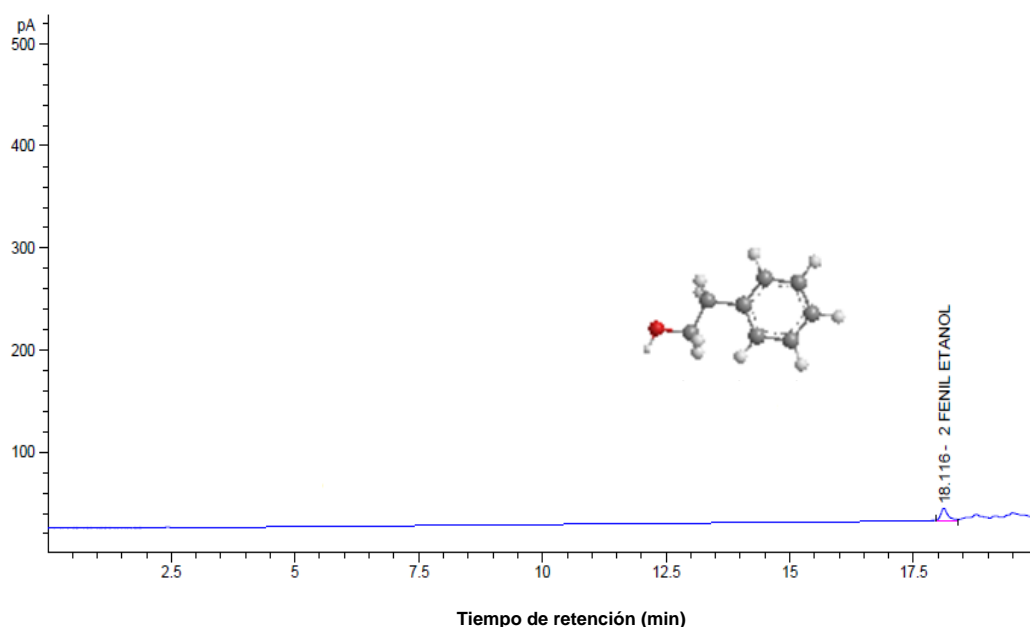


Figura 144. Cromatograma (CG/FID) del compuesto con aroma a rosas 2-FE a las 24 h en LD1 a 28 °C/120 rpm.

Utilizando el ajuste del modelo de Monod, se obtuvo una velocidad de formación de producto (rp) de $0.0029 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.98. Ésta ecuación describe la formación del producto asociado al crecimiento, con un crecimiento exponencial a lo largo de las

fermentaciones de lactosuero dulce, acompañado de la formación de 2-FE. Este comportamiento ya ha sido descrito por algunos autores (**Garavaglia et al., 2007; Etschmann et al. 2004; Stark et al. 2003**), quienes atribuyen este comportamiento, a la complejidad del sustrato empleado. Estos resultados se sustentan, con la ecuación de Monod (**Scott, 2008**) para la formación de producto asociada con el crecimiento ($rp = Y_{p/c} rg$) Adicionalmente, se observó un incremento en la formación de etanol (12.79 g/L) a las 72 h.

Tabla 9. Variación en la concentración de distintos parámetros durante la fermentación de lactosuero por *K. marxianus* a 28 °C/120 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (%)	Concentración de levaduras (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	4.82 ± 0.083	2.60X10 ⁶ ± 1.10X10 ⁶	ND
6	47.65 ± 5.55	4.75 ± 0.002	1.80X10 ⁷ ± 5.00X10 ⁶	ND
24	134.55 ± 2.45	3.82 ± 0.791	5.20X10 ⁸ ± 7.00X10 ⁷	9.12 ± 0.75
48	53.30 ± 1.30	2.38 ± 0.154	1.80X10 ⁹ ± 3.00X10 ⁸	11.37 ± 0.39
72	16.25 ± 4.25	1.02 ± 0.244	1.30X10 ⁹ ± 2.00X10 ⁸	12.79 ± 0.08

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado

La velocidad específica de crecimiento de *K. marxianus* (μ) del promedio de dos cinéticas, utilizando el ajuste del modelo de Monod, fluctuó de 3.3 a 0.019 h⁻¹, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99. El decremento de μ se debe, tanto al consumo de sustrato utilizado en la fermentación, con una lactosa residual de 1.0 % como a la velocidad de formación de producto descrita anteriormente.

Se obtuvo un tiempo de generación (tg) de 1.15 h, estos resultados concuerdan con lo reportado para *K. marxianus* en medios nutritivos (**Steensma et al., 1988; Banat et al., 1998; Singh et al., 1998**). Sin embargo, el

crecimiento obtenido, determinado por el tiempo de generación (tg 1.15 h), es más rápido que el reportado por **Mendoza et al. (2006)**, quienes obtuvieron un tg de 1.65 h en lactosuero desproteinizado.

Utilizando el ajuste del modelo Gompertz, se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento (μ_m) de 0.26 h^{-1} con un R^2 de 0.99 (Figura 15). Estos valores se encuentran ligeramente por debajo de lo reportado por **Araujo et al. (2007)**, quienes obtuvieron una μ_m de 0.29 h^{-1} . Estas diferencias podrían deberse a la complejidad del sustrato empleado. El recuento de células presentó un crecimiento exponencial, con una concentración máxima de $1.80 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ a las 48 h de incubación, estos resultados reflejan la afinidad de la cepa nativa de *K. marxianus* por el sustrato bajo estudio.

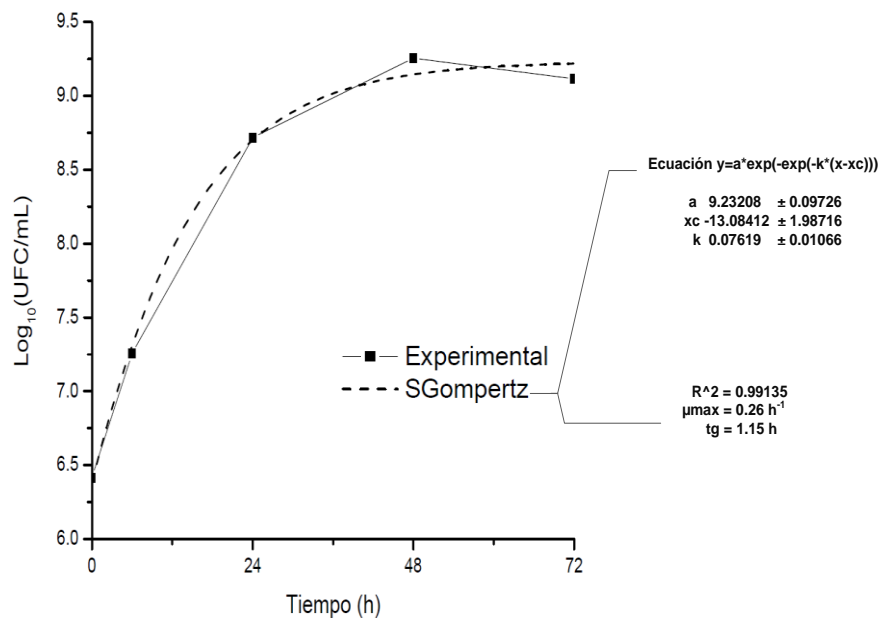


Figura 15. Ajuste del modelo Gompertz para las fermentaciones de LD a pH 4.8, 28 °C/120 rpm, donde a, xc y k son parámetros matemáticos que describen la curva sigmoideal.

Por otro lado, los resultados obtenidos del recuento celular son superiores ($1.80 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$) a lo reportado por **Yadav et al. (2014)**, quienes reportaron un máximo alcanzado de $5.10 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ en lactosuero diluido. Por otro lado, se obtuvo un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de

0.30 g/g, que corresponden. Estos resultados son ligeramente superiores a lo reportado por **Páez et al. (2012)**, quienes obtuvieron un rendimiento de 0.20 g/g, utilizando lactosuero desproteinizado, con una concentración inicial de lactosa de 47 g/L.

El consumo de lactosa fue de ~ 80 % a las 72 h de incubación, parte del sustrato empleado para mantener las actividades celulares, expresado como mantenimiento celular (m) fue de 0.09 h^{-1} a las 48 h de incubación, presentando una tasa de consumo de sustrato ($-r_s$) de $0.54 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, obteniéndose un coeficiente de correlación (R^2) de 0.97 (Figura 16).

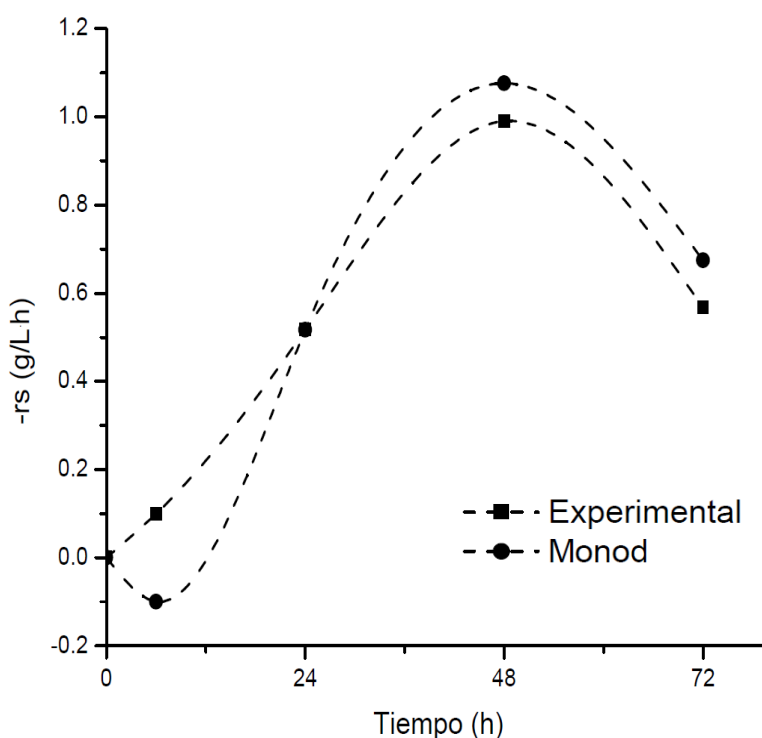


Figura 16. Ajuste de la ecuación de Monod para la velocidad de consumo de sustrato de las fermentaciones de lactosuero dulce a pH 4.8, 28 °C/120 rpm.

Estos resultados podrían indicar que la mayor parte del consumo de sustrato se utilizó para la formación de nuevas células (Tabla 9), observándose

igualmente una disminución en la formación de 2-FE y un incremento en la biomasa a partir de las 48 h de incubación. Estos resultados se sustentan de acuerdo a las leyes de velocidad de Monod, que consideran que además del consumo de sustrato para producir nuevas células, parte del sustrato se emplea simplemente para mantener las actividades cotidianas de las células. El término correspondiente de utilización para mantenimiento es:

$$m = \frac{g \text{ sustrato}}{g \text{ peso seco}}$$

La velocidad de disminución de sustrato se calculó de la siguiente manera:

$$-rs = Y_{s/x} rg + mC_c$$

Además de lo antes mencionado, otros nutrientes como el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), pudieron haber influido en la formación de 2-FE. Se ha reportado que es necesaria una fuente de nitrógeno adecuada para la producción del 2-FE (**Äyräpää, 1965**). El contenido de NFA presente en el LD (Tabla 7) fue de 169.5 mg/L. Sin embargo, se ha reportado que sólo el 25% de este nutriente presente en el lactosuero puede ser utilizado por *K. marxianus* (**Etschmann et al., 2002**).

6.3. Evaluar la producción de 2-FE en fermentaciones de lactosuero dulce (LD), lactosuero ácido (LA) y lactosuero de requesón (LR) con *Kluyveromyces marxianus*.

6.3.1. Formulación 1(Agitación 180 RPM)

Para el **lactosuero dulce (LD)**, se obtuvo una concentración máxima de 2-FE de 96 mg/L a las 48 h. En el cromatograma (Figura 17) podemos observar el pico de la señal del compuesto 2-FE, que presenta un área bajo la curva de 131.21 pa seg⁻¹, con un tiempo de retención de 10.08 min. Estos resultados, concuerdan con la comparación con patrones para 2-FE. La

velocidad de formación de producto (rp) obtenida para 2-FE fue de $0.009 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.82.

Tanto la concentración de 2-FE, como la velocidad de formación de producto, son menores que las obtenidos para el lactosuero obtenido de la productora de quesos del Estado de Durango- LD1 ($0.0029 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), lo que se ve reflejado en la producción de 2-FE con este sustrato (Tabla 10).

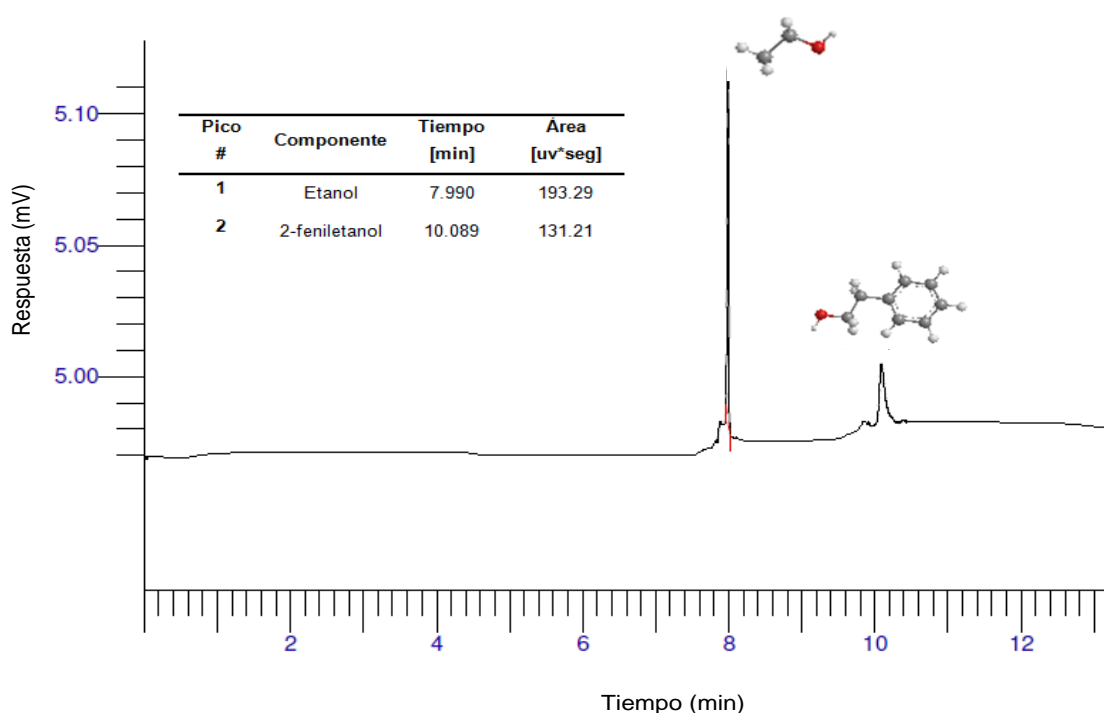


Figura 157. Cromatograma (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD a $30^\circ\text{C}/180 \text{ rpm}$.

Estas diferencias se deben, principalmente, como se discutió en el apartado 6.2, a la composición de cada tipo de lactosuero. El LD1 presentó un mayor contenido de proteína (0.71 %) y grasa (0.87%), a diferencia del LD (lactosuero del Estado de Hidalgo). Lo que, entre otras cosas, incrementa la concentración de NFA. Se ha reportado que la complejidad de la fuente de nitrógeno, puede influir en el metabolismo de la levadura y consecuentemente,

en la cantidad de metabolitos secundarios producidos durante la fermentación (Bayonove *et al.*, 2000).

Tabla 10. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con *K. marxianus* a 30 °C/180 rpm .

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de levaduras (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	54.10 ± 1.48	9.09x10 ⁶ ± 1.2 x10 ⁶	ND
24	53 ± 0.014	41.55 ± 3.19	1.48 x10 ⁸ ± 2.0x10 ⁷	4.52 ± 0.92
48	96 ± 0.008	31.67 ± 1.32	9.21 x10 ⁸ ± 2.0x10 ⁷	3.82 ± 1.78
72	49 ± 0.009	26.17 ± 0.73	1.13x10 ⁹ ± 8.6x10 ⁷	6.79 ± 1.66
96	36 ± 0.006	12.70 ± 2.38	7.93x10 ⁸ ± 2.6x10 ⁷	15.59 ± 1.92

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado

Además del análisis bromatológico, este tipo de lactosuero se analizó por resonancia magnética nuclear (RMN) y por polarimetría. La extracción con el disolvente (DMSO) al LD, dio lugar a un sólido blanco (14 mg, 0.17%), que mostró una rotación óptica de +28, utilizando una radiación monocromática de λ -589 nm a 20 °C ($[\alpha]_D^{20}$). Estos resultados nos indican la presencia de una molécula dextrógira. Este sólido se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos (Jawad *et al.*, 2012) como la mezcla de la (+)- β -lactosa y (+)- α -lactosa.

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 18) presentó entre sus señales más significativas, dos señales dobles ($J=7.9$ Hz) en δ 4.49 y 4.28 ppm, características de protones anoméricos, asignados para H-1 y H-1', correspondientes a la β -lactosa. Entre δ 3.8 y 3.0 ppm, se observó el resto de

las señales presentes en la estructura. Adicionalmente, en δ 5.06 ppm, se observa una señal doble ($J=3.5$ Hz), que podría corresponder al protón anomérico de la α -lactosa. Considerando la integración del espectro de RMN de protón, se determinó que el contenido de β -lactosa es del 82.35 % y del 17.64 % para α -lactosa. Estos resultados, podrían explicar el consumo de la β -lactosa por *K. marxianus* que desencadena en el incremento de la producción de 2-FE en este tipo de lactosuero.

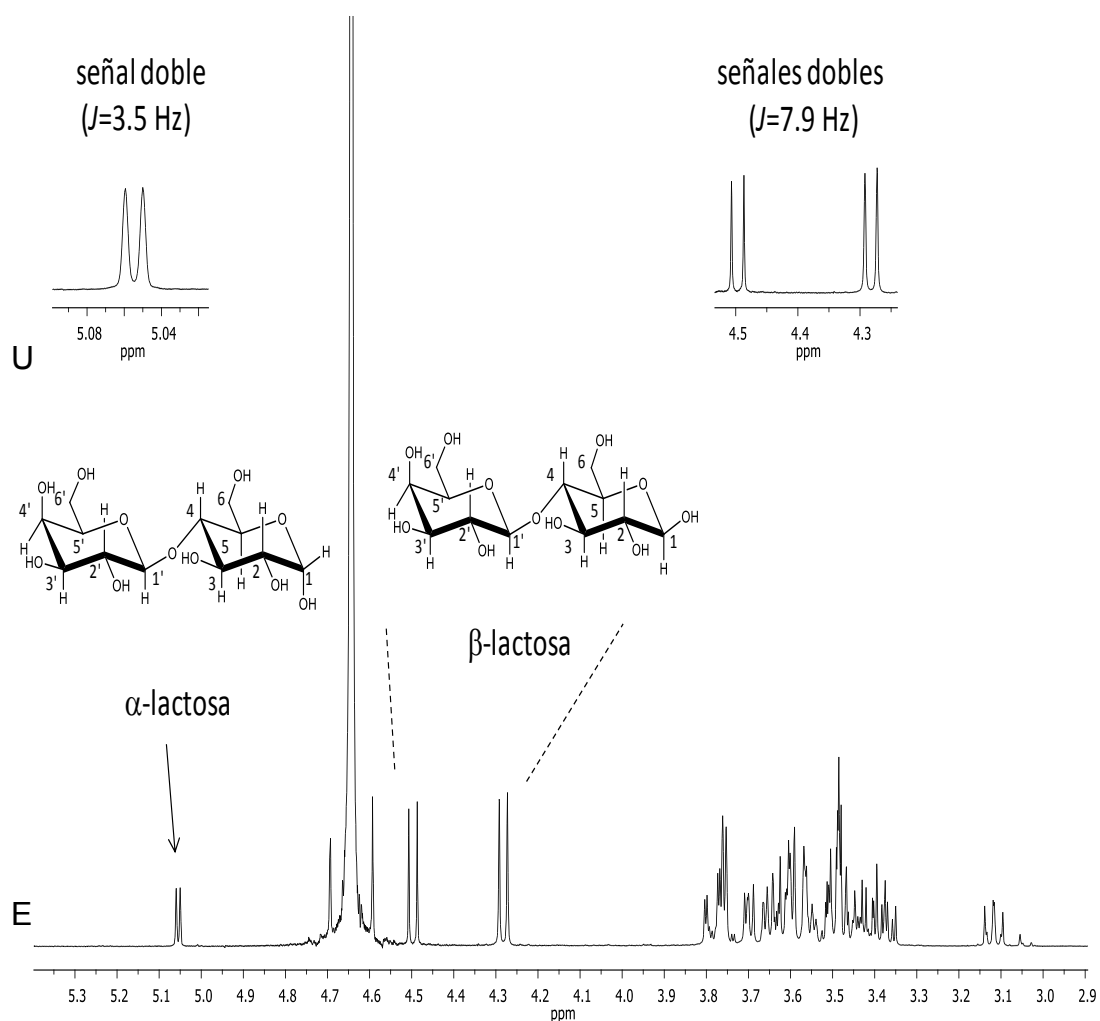


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en D_2O de la lactosa del lactosuero dulce .

Utilizando el ajuste del modelo de Monod, se obtuvo una velocidad de consumo de sustrato ($-r_s$) de $0.52 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.95 y un contenido de lactosa residual de 12.70 g/L (96 h). Los resultados de $-r_s$ son ligeramente menores que los obtenidos en LD1 (0.54). Lo que se ve reflejado en la producción de 2-FE (Tabla 10). Para este método diferencial, se consideró una reacción isotérmica en un reactor intermitente, de volumen constante, registrando la concentración en función del tiempo, observándose una reducción considerable del sustrato (76%) a las 96 h, con un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de 0.19 g/g .

Se obtuvo una velocidad de formación de producto, con valores que oscilan entre 0.002 a $-5.67 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.98 (Figura 19). *K. marxianus* ITD00262 presentó un crecimiento exponencial con una concentración máxima de $1.13 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$, acompañado de la formación de 2-FE (49 mg/L), hasta un tiempo de 72 h. La velocidad específica de crecimiento (μ) para *K. marxianus* ITD00262, fluctuó entre 0.32 y 0.01 h^{-1} . Mientras que los tiempos de generación (t_g) obtenidos del ajuste de los modelos de crecimiento sigmoidal Gompertz, Richards y Logístico, fueron de 1.98, 1.67 y 2.70 h (Figura 20). Aplicando la solución de la ecuación para cada modelo matemático, se obtuvieron las velocidades máximas de crecimiento específico (μ_m) de 0.15, 0.18 y 0.11 h^{-1} , para estas cinéticas. El resultado de este análisis arrojó un mejor ajuste para el modelo de Richards, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.98.

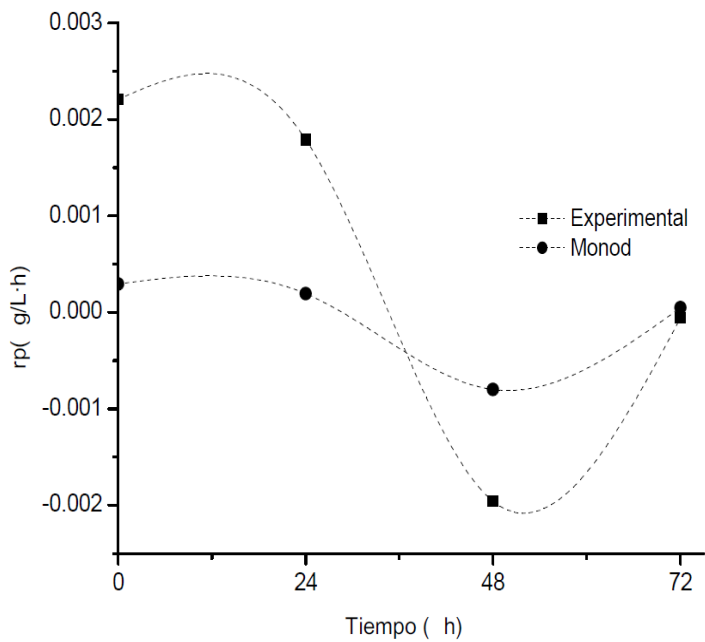


Figura 19. Ajuste de la ecuación de Monod para la velocidad de formación de producto (rp) de las fermentaciones de lactosuero dulce a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

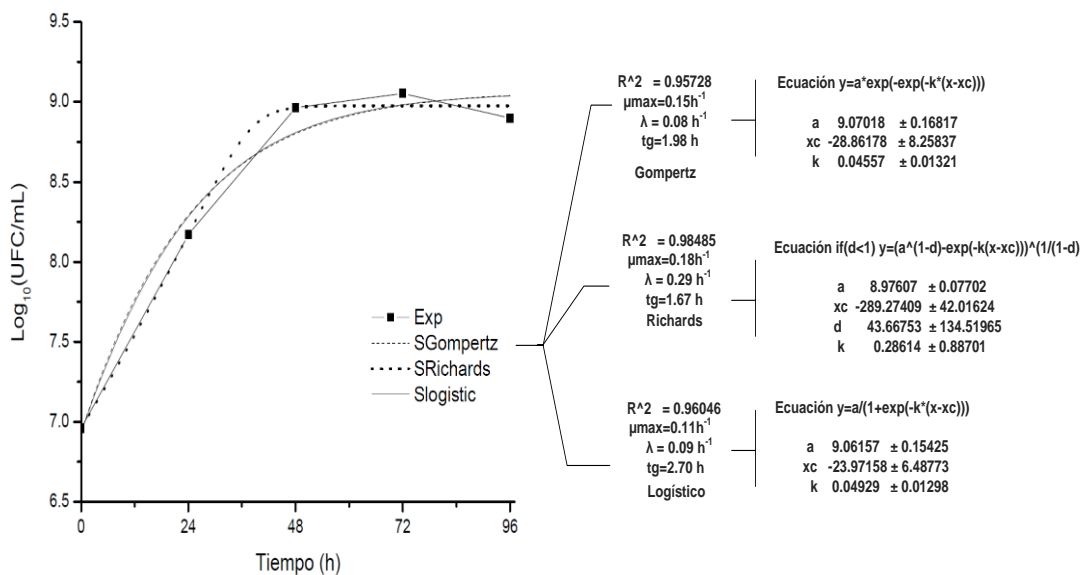


Figura 160. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de lactosuero dulce a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Además del sustrato y la concentración de levaduras, se ha reportado que la producción de etanol puede influir en la formación de 2-FE. Así que utilizando la ecuación de Monod, se obtuvo la velocidad de crecimiento de inhibición por producto (r_g) para etanol de $0.87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con una constante (K_{obs}) de 0.16 y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.97 (Figura 21). Estos resultados indican una inhibición por la concentración de etanol, no así para 2-FE, donde el coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.38. Lo que concuerda con los resultados obtenidos, en donde el incremento de la concentración de etanol a las 96 h (15.59 g/L) afecta la producción de 2-FE con una disminución de 49 a 36 mg/L (Tabla 10).

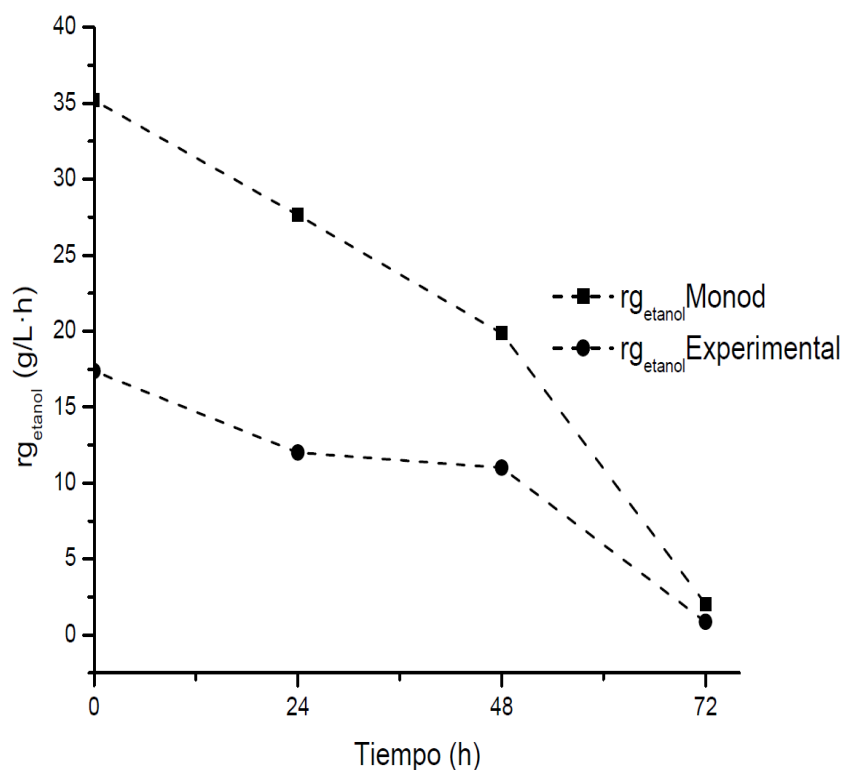


Figura 17. Ajuste de la ecuación de Monod para la inhibición por producto (r_g etanol) de las cinéticas de lactosuero dulce a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Para el **lactosuero ácido (LA)**, la máxima producción de 2-FE fue de 70 mg/L (96 h), con una velocidad de formación de producto (rp) de 0.007 g L⁻¹ h⁻¹ y un coeficiente de correlación (R²) de 0.90 (Figura 22). En el cromatograma se puede observar la señal para 2-FE, con un área bajo la curva de 117.72 pa seg⁻¹ y un tiempo de retención de 10.09 min (Figura 23).

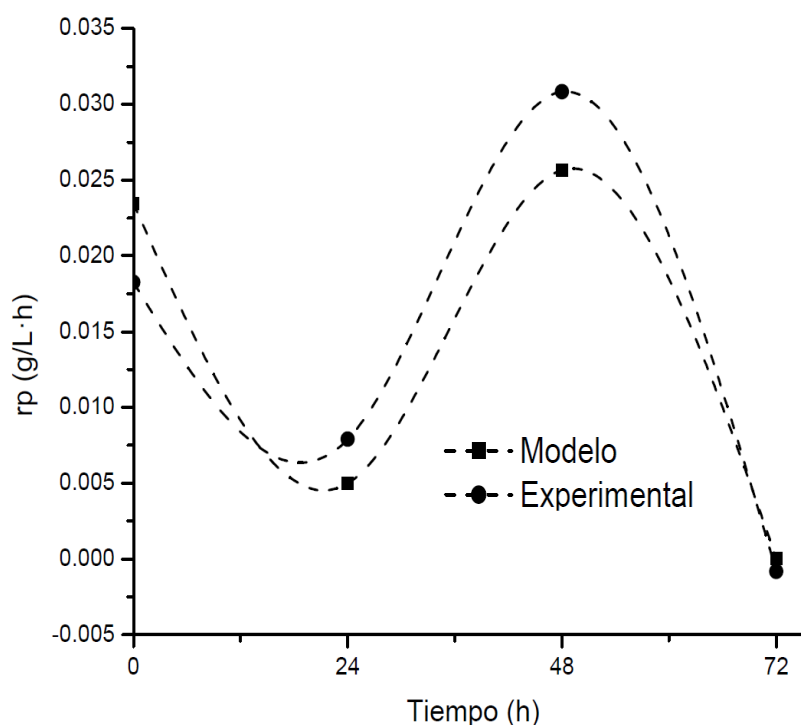


Figura 182. Ajuste de la ecuación de Monod para la velocidad de formación de producto (rp) de las cinéticas de LA a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

La producción de 2-FE, fue menor que la obtenida en las cinéticas de LD (96 mg/L), esto se debe entre otras cosas, a la composición del lactosuero y a la cantidad de sustrato, que es utilizado tanto para el mantenimiento celular, como para la formación de otros metabolitos como etanol. Este sustrato (LA) presenta un mayor contenido de proteína (0.91%) y de grasa (0.5%) a diferencia del LD.

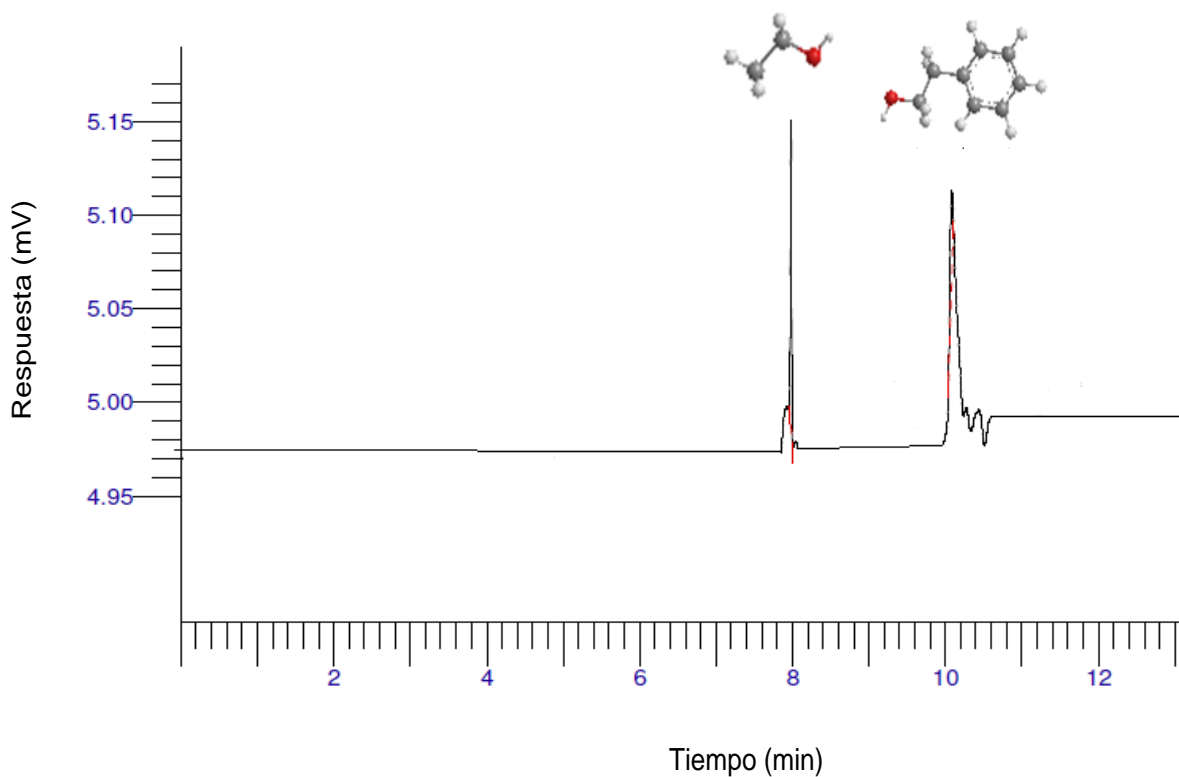


Figura 193. Cromatograma (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 96 h en LA a 30 °C/180 rpm.

El rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa), para las cinéticas de LA, fue de 0.21 g/g, estos resultados son ligeramente superiores que los obtenidos en las cinéticas de LD (0.19 g/g). El rendimiento concuerda con los resultados sobre el consumo de lactosa (91.80 %) para estas cinéticas a las 48 h. El consumo de lactosa fue del 94.52 % (96 h), con una velocidad de consumo de sustrato ($-r_s$) de $0.55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.98.

Tabla 31. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero ácido con *K. marxianus* a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de células (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	46.36 ± 0.803	6.28x10 ⁶ ± 7.0 x10 ⁵	ND
24	9 ± 0.008	17.20 ± 5.679	2.59 x10 ⁸ ± 2.0 x10 ⁷	24.31 ± 4.075
48	32 ± 0.011	3.80 ± 0.604	1.48 x10 ⁹ ± 3.1 x10 ⁸	33.93 ± 5.077
72	69 ± 0.037	2.75 ± 0.126	9.50 x10 ⁸ ± 1.5 x10 ⁸	41.53 ± 7.762
96	70 ± 0.026	2.54 ± 0.131	6.41 x10 ⁸ ± 1.1 x10 ⁸	45.90 ± 5.732

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado

La extracción del disolvente (DMSO) al LA, dio lugar a un sólido blanco (13 mg, 0.17%) que mostró $[\alpha]_D^{20} = +34^\circ$. Los resultados concuerdan con lo reportado por **Jawad et al. (2012)**, quienes reportan para (+)-β-lactosa un rotación óptica de +34°. A diferencia del LD, este tipo de lactosuero presenta en una proporción considerable una conformación de β-lactosa, considerando que la muestra no se encuentra totalmente pura, al ser obtenida de una productora de quesos y no de un reactivo sintético.

El espectro de RMN de ¹H (Figura 24) presentó entre sus señales más significativas, dos señales dobles ($J=8.1$ Hz) en δ 4.36 y 4.15 ppm, características de protones anoméricos, asignados para H⁻¹ y H^{-1'}, correspondientes a la β-lactosa. Entre δ 3.7 y 2.9 ppm, se observaron el resto de las señales presentes en la estructura.

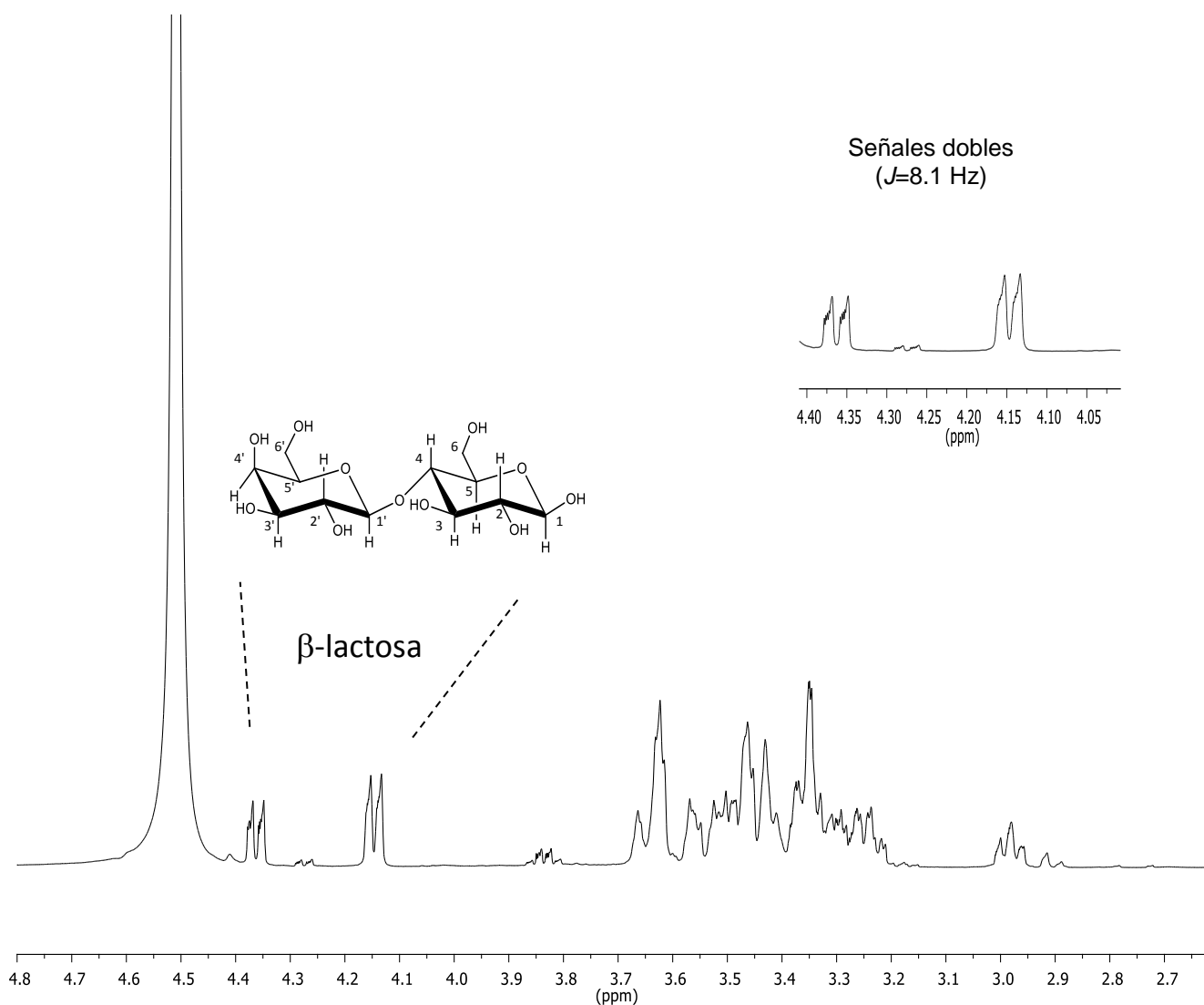


Figura 204. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en D_2O de la lactosa del LA.

Utilizando el ajuste de los modelos de crecimiento sigmoidal Gompertz, Richards y Logístico, se obtuvieron las velocidades máxima de crecimiento específico (μ_m) para *K. marxianus* en LA de 0.22, 0.25 y 0.22 h^{-1} , respectivamente. Estas velocidades son mayores que las obtenidas en LD, lo que concuerda con los resultados del consumo de lactosa y de la producción de biomasa, obtenidas en estas cinéticas (Tabla 11). Los tiempos de generación (tg), fueron de 1.33, 1.20 y 1.33 h. Siendo el modelo de Richards el de mejor ajuste, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99 (Figura 25). Los valores

de t_g fueron menores que los obtenidos en LD, lo que podría deberse a la concentración elevada de etanol obtenida a las 96 h (45.90 g/L). Para la aplicación del modelo de Monod, se asume que la fase lag no existe, ésta premisa se comprobó también con los modelos de crecimiento sigmoidal Gompertz, Richards y Logístico, en donde se obtuvo una fase lag de 0.12, 0.25 y 0.22 h⁻¹, respectivamente.

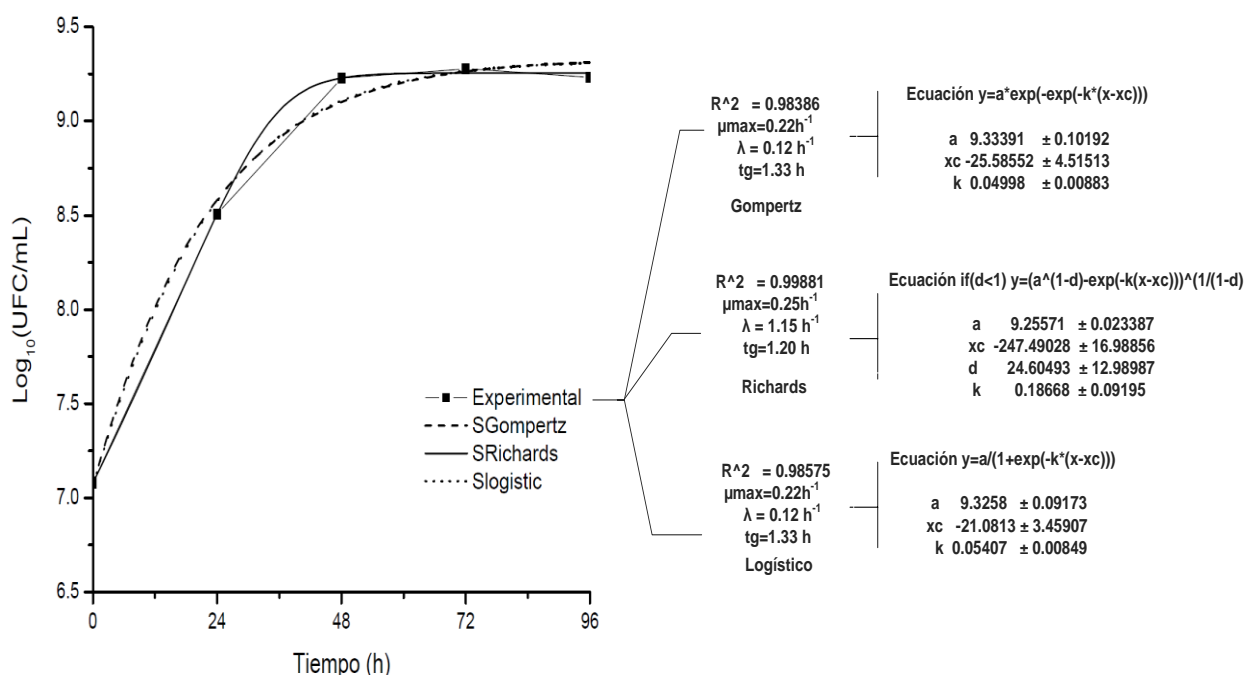


Figura 21. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de lactosuero ácido a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Se obtuvieron concentraciones de etanol superiores (45.90 g/L) que las obtenidas en lactosuero dulce (15.59 g/L) (Tabla 6 y 9), con una productividad de 0.70 g L⁻¹ h⁻¹. Tanto la productividad (0.67 g L⁻¹ h⁻¹), como la concentración de etanol (45.90 g/L), se encuentran por encima de los valores reportados por algunos autores en lactosuero desproteinizado y concentrado, en concentraciones similares de lactosa (**Rosenberg et al., 1995; Ozmihci et al., 2007**).

Como se muestra en la Tabla 11, la formación de etanol es acompañada de la producción de 2-FE hasta las 96 h (Figura 27). **Rong et al. (2011)**, reportaron que 2-FE puede ser producido a partir de L-fenilalanina, con la oxidación de etanol, por la vía que envuelve el glioxilato (**Wittmann et al., 2002**), lo que podría haber ocurrido en estas cinéticas.

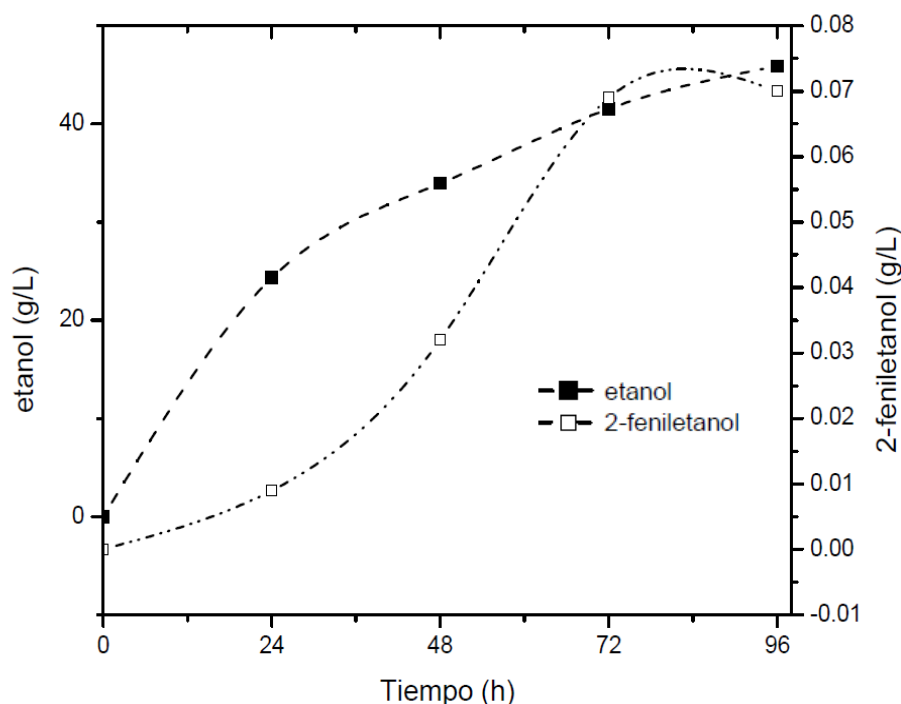


Figura 22. Producción de 2-FE y etanol en cinéticas de LA, 30°C/180 rpm.

Para el **lactosuero de requesón (LR)**, la producción máxima de 2-FE fue de 47 mg/L a las 96 h. La velocidad de formación de producto (rp) determinada por la ecuación de Monod, fue de $0.006 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.90. Estos resultados, se encuentran por debajo de las velocidades de formación de producto, obtenidas para las fermentaciones de lactosuero dulce (LD) y ácido (LA) ($0.009 / 0.007 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), lo que sugiere un mayor tiempo para la formación de 2-FE.

Tabla 4. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero de requesón con *K. marxianus* a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de células (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	41.71 ± 3.40	8.09 x10 ⁶ ± 7.8 x10 ⁵	ND
24	24 ± 0.011	17.76 ± 0.72	6.14 x10 ⁸ ± 3.0 x10 ⁷	2.08 ± 0.935
48	26 ± 0.009	11.16 ± 0.91	1.02 x10 ⁹ ± 9.0 x10 ⁸	12.70 ± 4.785
72	45 ± 0.012	9.47 ± 1.65	8.09 x10 ⁸ ± 7.4 x10 ⁸	24.38 ± 4.801
96	47 ± 0.010	6.94 ± 2.38	7.50 x10 ⁸ ± 3.7 x10 ⁸	25.33 ± 2.740

La remoción de lactosa fue del 83.36 %, con una velocidad de consumo de sustrato (-rs) para estas cinéticas de 0.32 g L⁻¹ h⁻¹ (R²=0.99) (Figura 27). El contenido de lactosa residual fue de 6.94 g/L, con una concentración mayor de lactosa que la alcanzada en LA (2.54 g/L). Sin embargo, a pesar del consumo significativo de lactosa, la producción de 2-FE no fue superior que la obtenida en las cinéticas de LD (96 mg/L). Que puede deberse principalmente a la composición del sustrato, pero también a la concentración tanto de etanol como de biomasa.

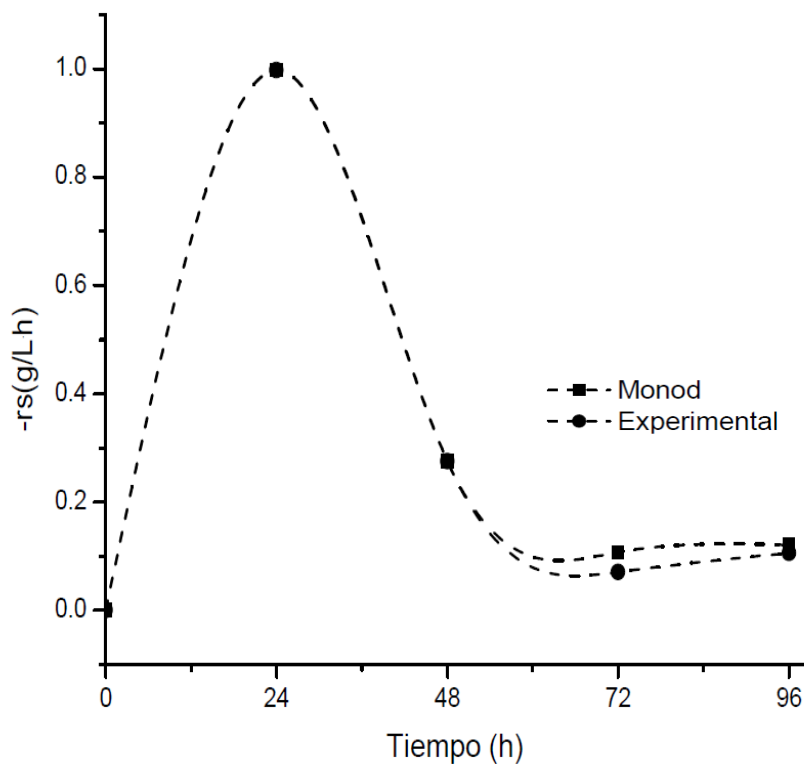


Figura 23. Velocidad de consumo de sustrato (-rs) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de lactosuero de requesón a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Respecto a la conformación de la lactosa, se realizó un análisis polarimétrico y de RMN (Figura 28). La extracción con el disolvente DMSO dió lugar a un sólido blanco en el lactosuero de requesón (LR) (15 mg, 0.17%) que mostró $[\alpha]_D^{20} = +33^\circ$.

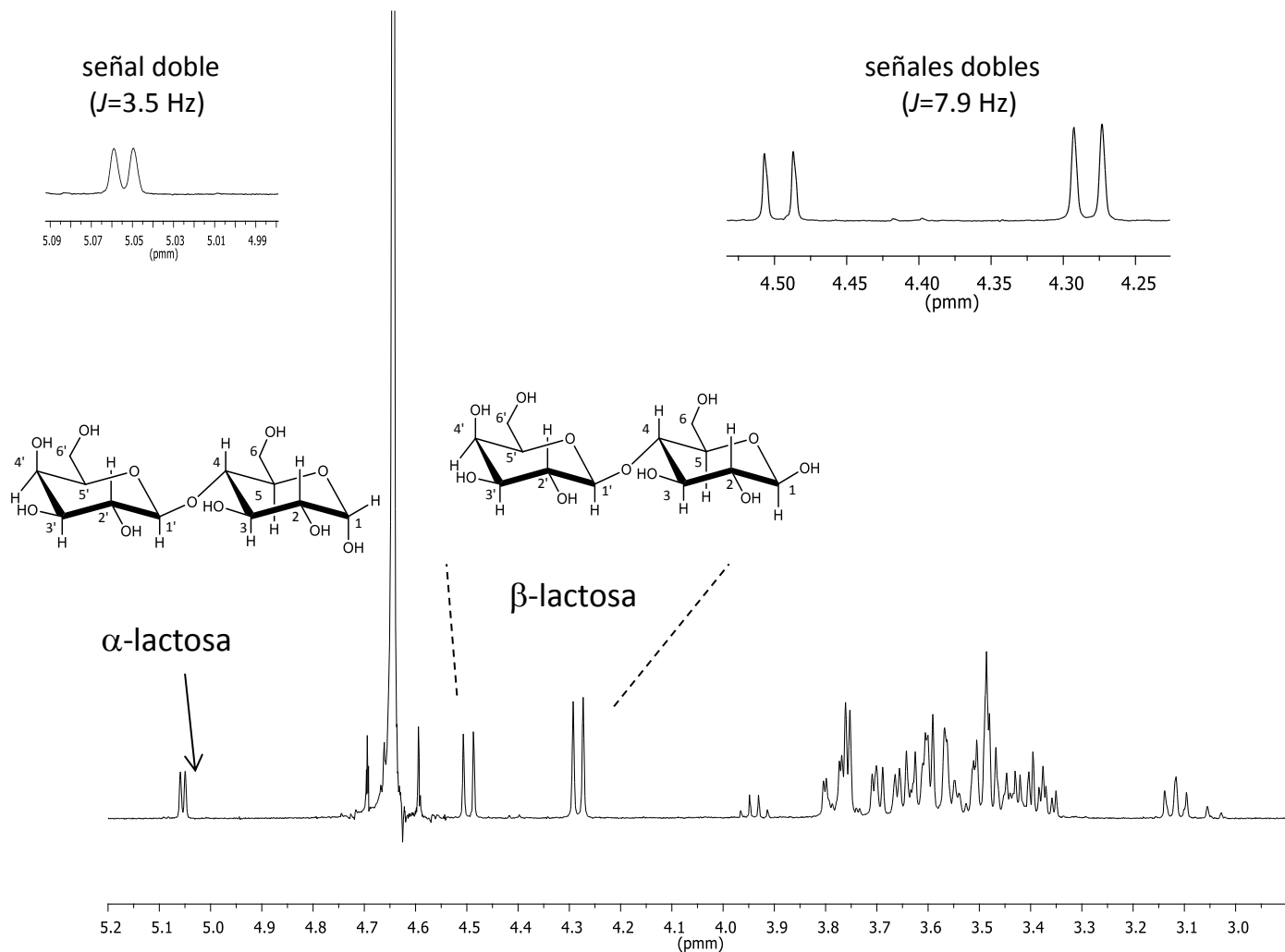


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en D_2O de la lactosa del LR.

El espectro de RMN de ^1H (Figura 28), dos señales dobles ($J=7.9$ Hz) en δ 4.50 y 4.28 ppm, características de protones anoméricos, asignadas para H-1 y H-1', correspondientes a la β -lactosa. En δ 5.12 ppm, se observó una señal doble ($J=3.5$ Hz) que podría corresponder al protón anomérico de la α -lactosa. Adicionalmente, entre δ 3.8 y 2.9 ppm, se observó el resto de las señales presentes en la estructura. A diferencia del LD, este tipo de lactosuero presenta en una proporción considerable la formación de β -lactosa (97.05 %).

Se obtuvo un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de 0.17 g/g, con un crecimiento exponencial y un recuento de células, con una concentración máxima de 1.02×10^9 UFC/mL a las 48 h. Las velocidades máximas de crecimiento específico (μ_m) obtenidas con los modelos de crecimiento sigmoidal Gompertz, Richards y Logístico, fueron 0.15, 0.15 y 0.16 h^{-1} , respectivamente (Figura 29). Estos resultados, son similares a los obtenidos en las fermentaciones de lactosuero ácido, que pueden ser explicados con el aumento de células por unidad de tiempo (Tabla 11), lo que describe una menor tasa de crecimiento específica (μ_m). La fase de latencia fue de ~ 0 , con valores de 0.0, 0.88 y 0.08 h^{-1} , para los modelos Gompertz, Richards y Logístico, respectivamente. Estos resultados, son comprobatorios para definir una fase de latencia ~ 0 , como premisa para la aplicación de las ecuaciones de Monod en la descripción de nuestro tratamiento. La concentración de etanol fue de 29.41 g/L (96 h) con una productividad de $0.21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Estos resultados se encuentran por encima de los reportados por **Rosenberg et al. (1995)**, para lactosuero desproteinizado.

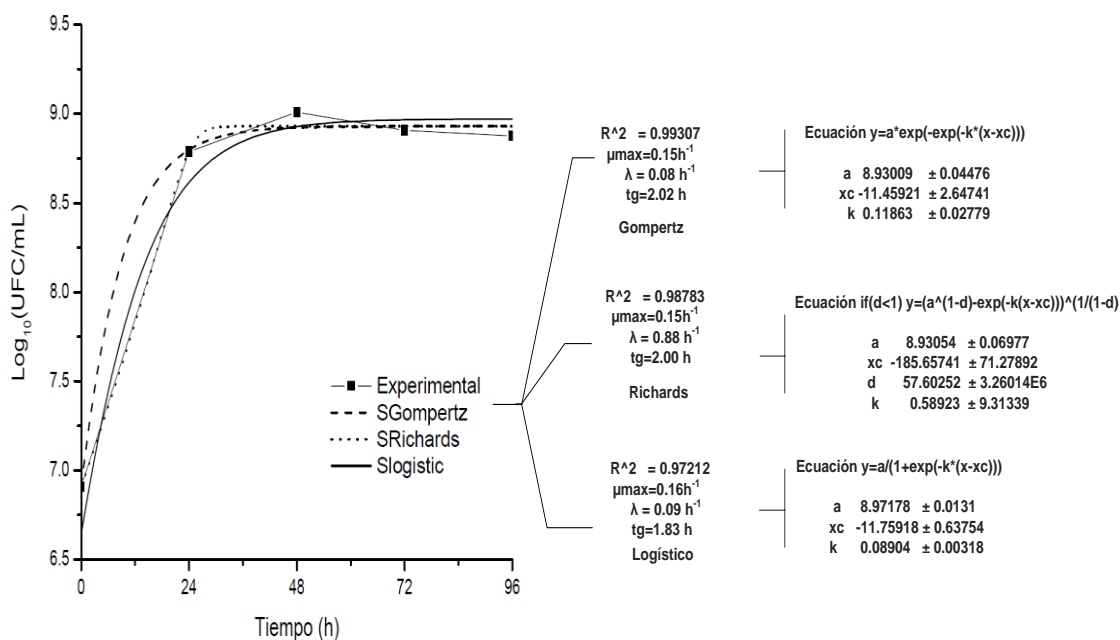


Figura 29. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de lactosuero de requesón a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

A partir de las 96 h, se observó una disminución en el recuento celular (1.12×10^9 UFC/mL), no así en la producción de 2-FE (47 mg/L), ni de etanol (25.33 g/L). La ecuación del modelo de Monod (rg), demuestra el efecto de la concentración de etanol, sobre la producción de 2-FE (Figura 30), con valores que fluctúan de $55 - 0.029 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, una $K_{\text{obs}} = 0.70$ y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.91. **Rong et al. (2011)**, reportaron que concentraciones de etanol por encima de 25 g/L, afectan la producción de 2-FE, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

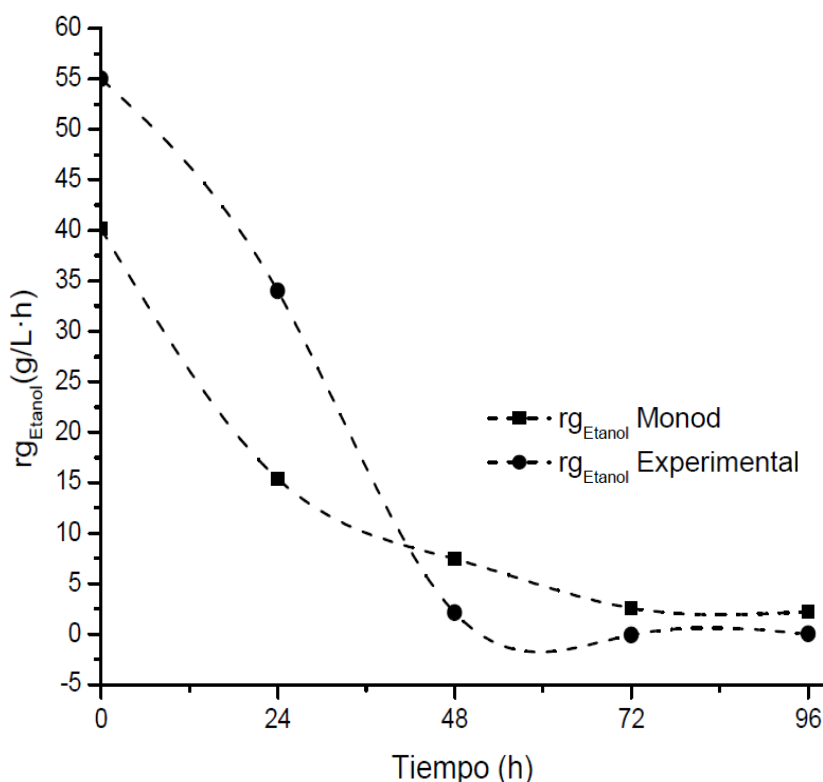


Figura 30. Ajuste de la ecuación de Monod (rg etanol) para las cinéticas de lactosuero de requesón a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Finalmente, en la Tabla 13, se muestra el comparativo de los resultados para cada tipo de lactosuero, destacando el LD sobre la producción de 2-FE (90 mg/L) en un tiempo de 48 h, con una velocidad de formación de

producto (rp) superior que la obtenidas en LA y LR. El rendimiento en biomasa fue similar que el obtenido en LA, con una diferencia significativamente baja, sobre la producción de etanol, lo que favoreció la producción de 2-FE. A diferencia del LR, el LD presenta una concentración mayor de α -lactosa. Bajo las evidencias antes mencionadas, respecto al LD, los siguientes experimentos en lote (batch), se llevaron a cabo utilizando este sustrato, los resultados se muestran en los apartados 6.1.2 – 6.1.6.

Tabla 13. Tabla comparativa de resultados de las cinéticas en LD, LA y LR a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

Parámetros	LD	LA	LR
2-FE(mg/L)	96	70	47
Etanol (g/L)	15.59	45.90	25.33
α (°)	+28	+ 34	+33
rp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.009	0.007	0.006
-rs (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.52	0.55	0.32
μ_m (h ⁻¹)	0.18	0.22	0.15
tg(h)	1.67	1.20	2.02
Y _{x/s} (g/g)	0.19	0.21	0.17
Recuento de levaduras (UFC/mL)	1.13 x10 ⁹	1.48x10 ⁹	1.02x10 ⁹
Lactosa residual (g/L)	12.70	2.54	6.94

α rotación óptica, **tg** tiempo de generación, **Y_{x/s}** rendimiento de biomasa, **rp** velocidad de formación de producto, **-rs** velocidad de consumo de sustrato

6.3. Evaluar el efecto de la concentración de L-FE sobre la producción de 2-FE con *K. marxianus*.

6.4.1. Formulación 2 (500 mg/L de L-FE en LD)

La producción de alcoholes superiores se da en función de la cantidad de amonio y aminoácidos presentes en el medio de cultivo. Se ha reportado que la adición de aminoácidos, significa que habrá un aumento en la producción de

varios alcoholes superiores, debido a la activación de la ruta de Ehrlich (**Giudici et al., 1990**). El efecto de la concentración de L-fenilalanina en el medio es fundamental para aumentar la producción de 2 FE, debido a que se considera el precursor dominante para la bioconversión (**Wittman et al., 2002**). Cuando la L-fenilalanina es la única fuente de nitrógeno disponible, la ruta de Ehrlich predomina sobre la síntesis de *novo*, la cual prevalece cuando hay bajas concentraciones de aminoácidos (**Etschmann et al., 2002**).

Resultado de los experimentos realizados en el apartado 6.3, el lactosuero con potencial para la producción de 2-FE fue el lactosuero dulce; debido a ello, se realizaron cinéticas de fermentación de éste lactosuero, adicionando 500 (Formulación 2) y 1000 (Formulación 3) mg/L L-fenilalanina, esto para identificar el efecto de L-FE sobre la producción de 2-FE.

Los resultados obtenidos con la adición de 500 mg/L de L-FE se muestran en la Tabla 14, en donde la máxima producción de 2-FE se obtuvo a las 96 h, con una concentración de 320 mg/L (96 h). Los cromatogramas de la producción máxima de 2-FE se muestran en la Figura 31. Estos resultados son superiores que los obtenidos en LD sin adición del precursor (96 mg/L), sin embargo, las concentraciones aún son bajas. Adicionalmente, no se observó una inhibición por producto, ya que la concentración de etanol máxima fue de ~ 19 g/L. Utilizando la ecuación de Monod, se obtuvieron los coeficientes de correlación de 0.70 para r_{etanol} y de 0.67 para la $r_{\text{2-FE}}$. Estos resultados sugieren, que no hay una inhibición por producto para este tratamiento.

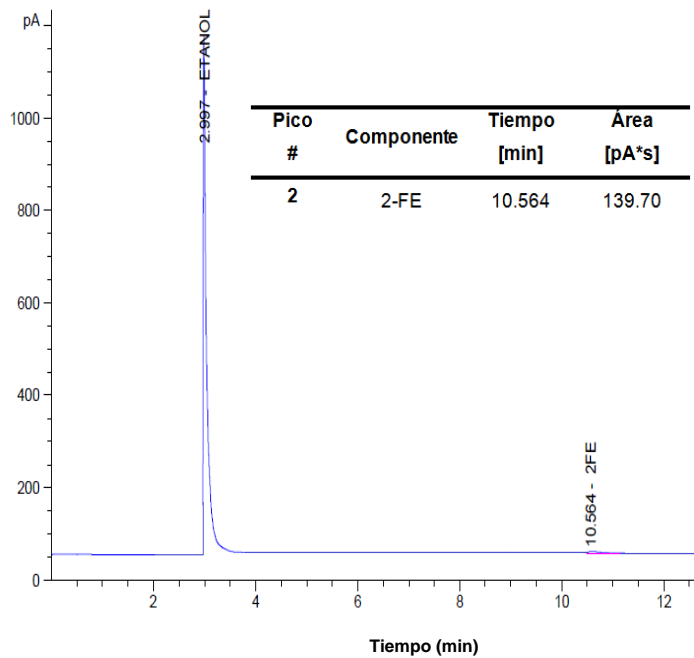
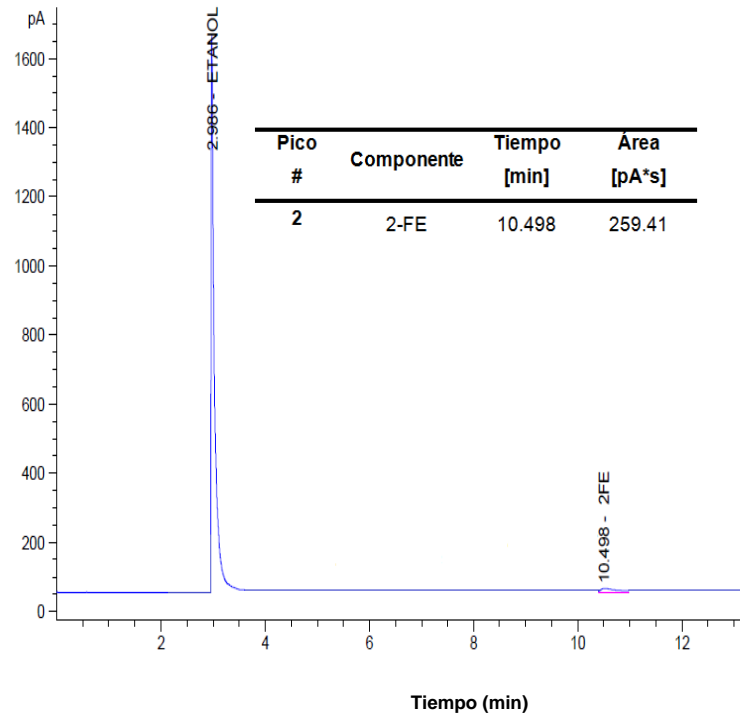
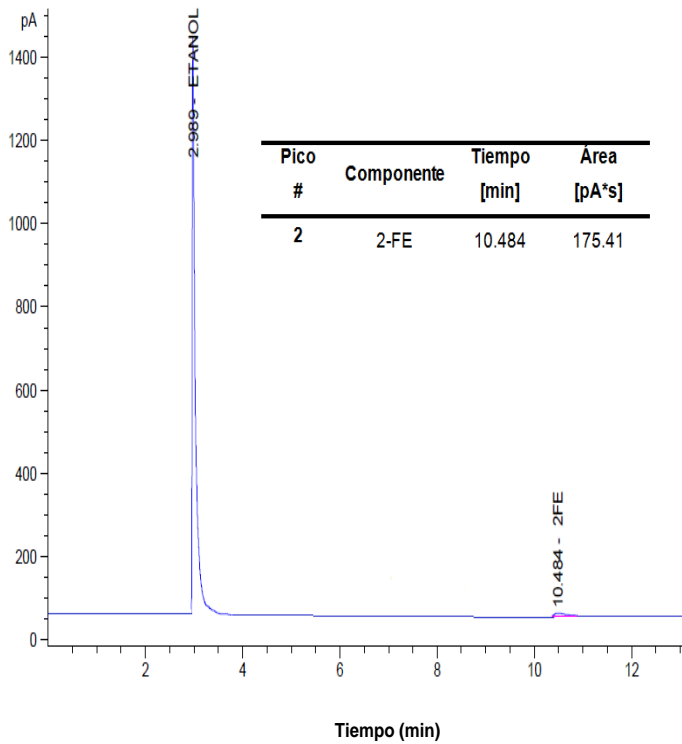


Figura 24. Cromatogramas (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD con 500 mg/L de L-FE a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

Tabla 14. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con *K. marxianus* a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de células (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	52.90 ± 3.870	1.2x10 ⁷ ± 1.1 x10 ⁶	ND
24	69 ± 0.069	20.57 ± 4.162	4.9x10 ⁸ ± 3.8x10 ⁷	5.94 ± 5.94
48	84 ± 0.037	12.93 ± 2.170	2.1x10 ⁹ ± 2.1x10 ⁸	14.08 ± 0.37
72	101 ± 0.069	5.14 ± 1.036	1.7x10 ⁹ ± 2.3x10 ⁸	18.34 ± 1.66
96	320 ± 0.140	0.81 ± 0.134	8.7x10 ⁸ ± 1.7x10 ⁸	18.69 ± 2.40

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado

La velocidad de formación de producto (rp) fue de 0.24 g L⁻¹ h⁻¹ (R²=0.98). Se observó un crecimiento exponencial, con una velocidad máxima de crecimiento específico (μ_m) de 0.19 h⁻¹. La concentración máxima de levaduras fue de 2.1 x10⁹ UFC/mL (48 h). El consumo de lactosa fue del 98.47 %, estos resultados superan a los reportados por **Aktas et al. (2007)**, quienes obtuvieron una remoción del 95% en lactosuero desproteinizado. La velocidad de consumo de sustrato (-rs) fue de 1.34 g L⁻¹ h⁻¹, con un coeficiente de correlación de 0.99 (Figura 32). Se obtuvo un rendimiento de biomasa (Y_{x/s}, en base a lactosa) de 0.28 g/g.

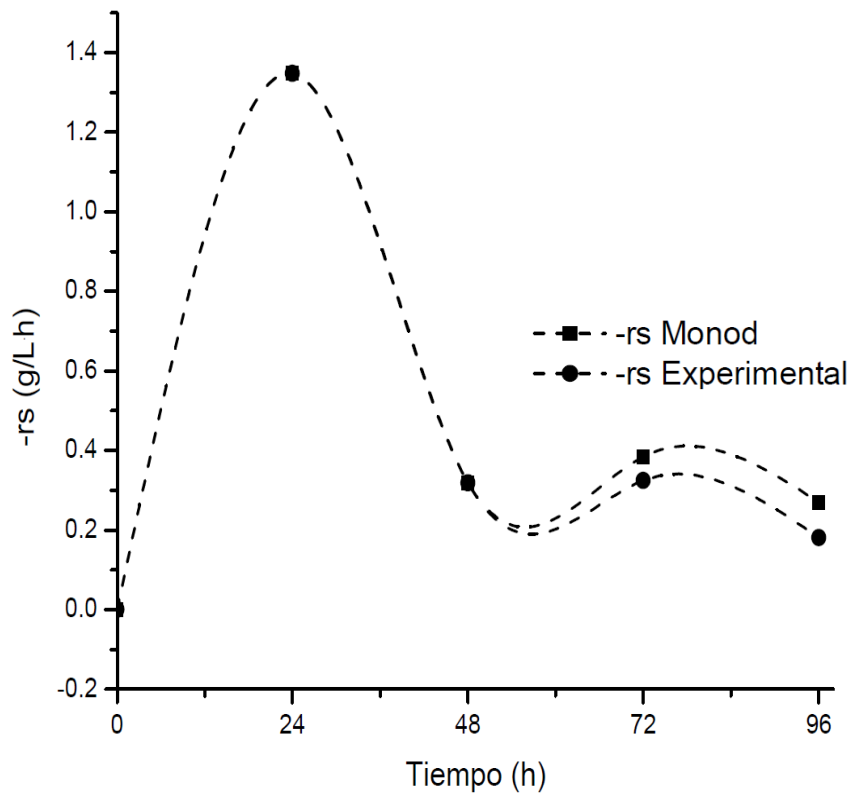


Figura 25. Velocidad de consumo de sustrato (-rs) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de LD con 500 mg/L L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Utilizando las ecuaciones de los modelos de crecimiento sigmoideal Gompertz, Richards y Logístico (Figura 33), se obtuvo un tg de 1.52, 1.77 y 2.27 h, respectivamente. Los tres modelos presentaron coeficientes de correlación de 0.90.

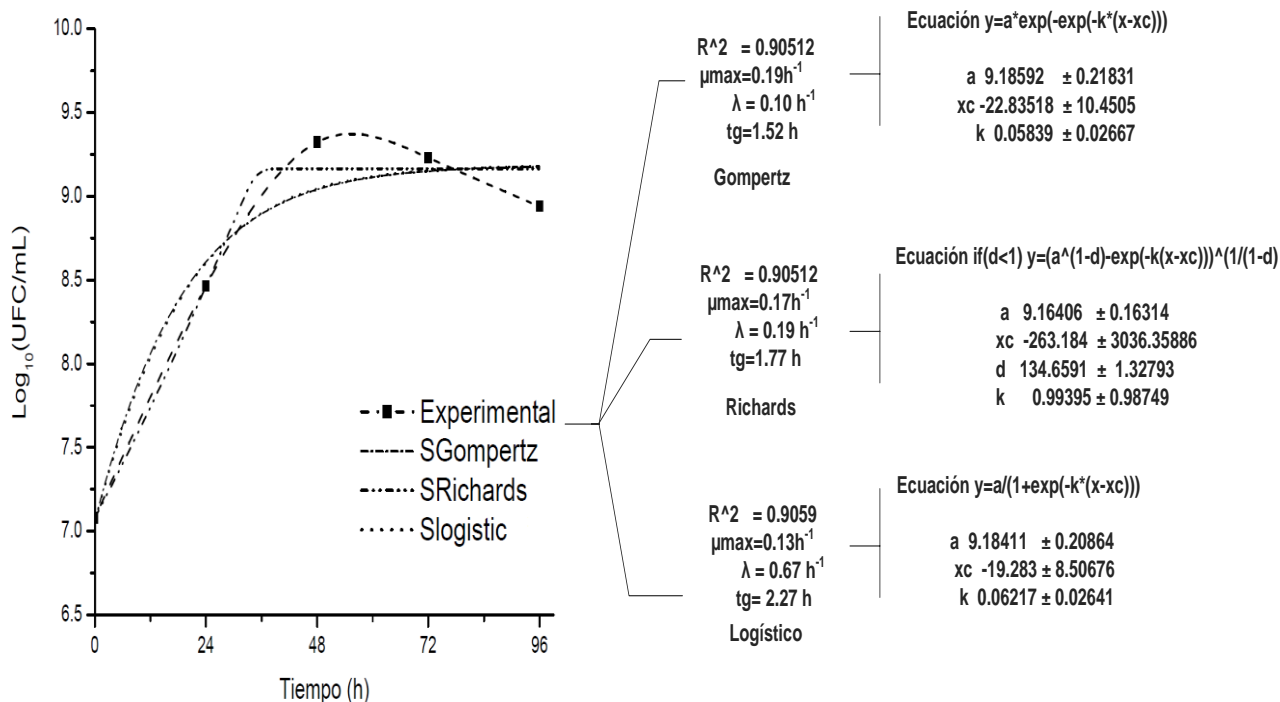


Figura 26. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las cinéticas de LD con 0.5 g/L de L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

6.4.2. Formulación 3 (1000 mg/L de L-FE en LD)

La máxima producción de 2-FE fue de 437 mg/L (48 h), un tiempo menor que el obtenido cuando adicionamos 500 mg/L de L-FE (96 h). La velocidad de formación de producto (rp) fue de 0.36 g L⁻¹ h⁻¹ (R²=0.98). Sin embargo, después de las 48 h, hay una disminución, tanto en la producción de 2-FE como de etanol y ligeramente en la concentración de biomasa (Tabla 15). Por otro lado, la ecuación de Monod para la inhibición por producto, nos arrojó una rg para etanol de 2.13 g L⁻¹ h⁻¹; n=0.5; K_{obs}=0.54, con un coeficiente de correlación (R²) de 0.93. Mientras que para 2-FE la rg=1.77 g L⁻¹ h⁻¹; n=;K_{obs}=0.81 con un coeficiente de correlación (R²) de 0.99; estos resultados sugieren, que hay una inhibición por producto para este tratamiento.

Respecto a la remoción de lactosa, ésta fue del 96.37 %. La velocidad de consumo de sustrato (-rs) fue de 1.27 g L⁻¹ h⁻¹, con un coeficiente de correlación de 0.99. Se obtuvo un rendimiento de biomasa (Y_{x/s}, en base a lactosa) de 0.44 g/g. Se observó un crecimiento exponencial, con una velocidad máxima de crecimiento específico (μ_m) de 0.21 h⁻¹. La concentración máxima de levaduras fue de 2.7 x10⁹ UFC/mL (48 h).

Utilizando las ecuaciones de los modelos de crecimiento sigmoidal Gompertz, Richards y Logístico (Figure 34) obtuvimos un tg de 1.47, 1.43 y 2 h. Estos resultados, al igual que el recuento de levaduras son ligeramente superiores que cuando añadimos 500 mg/L de L-FE.

Tabla 5. Concentración de los distintos parámetros de las cinéticas de LD con 1 g/L de L-FE a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de células (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	47.37 ± 5.725	8.9x10 ⁶ ± 1.1 x10 ⁵	ND
24	216 ± 0.108	16.77 ± 0.364	4.6x10 ⁸ ± 6.8x10 ⁷	17.74 ± 1.28
48	437 ± 0.037	3.42 ± 0.860	2.7x10 ⁹ ± 2.0x10 ⁸	23.71 ± 1.26
72	316 ± 0.069	2.01 ± 0.045	2.6x10 ⁹ ± 3.7x10 ⁸	16.79 ± 2.83
96	210 ± 0.060	1.72 ± 0.081	1.9x10 ⁹ ± 3.0x10 ⁸	14.33 ± 2.58

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado

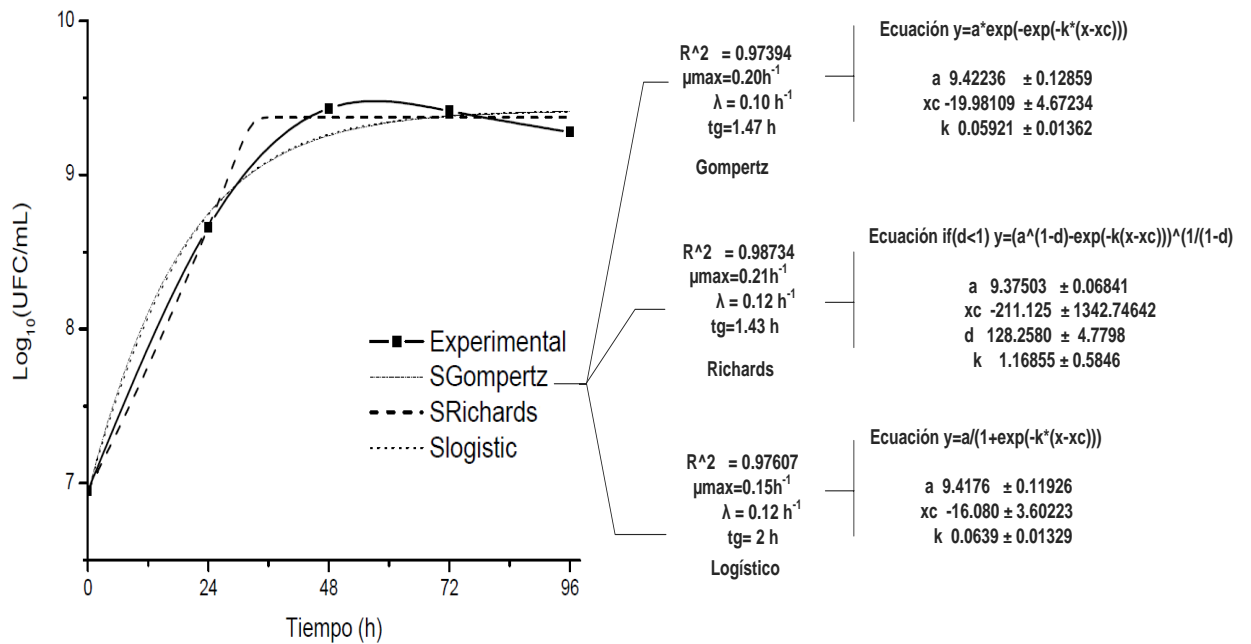


Figura 27. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las cinéticas de LD con 1 g/L de L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Finalmente, en la tabla 16, se muestran los resultados obtenidos para cada tratamiento con adición de L-FE. En este caso, ambos tratamientos presentan ventajas similares, la producción de 2-FE, fue mayor cuando adicionamos 1000 mg/L de L-FE. Además, presenta una velocidad de formación de producto (rp) más rápida, lo que se refleja en tiempos más cortos de producción de 2-FE.

Tabla 6. Tabla comparativa de resultados de las cinéticas en LD con 500 y 1000 mg/L de L-FE a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

Parámetros	500	1000
2-FE(mg/L)	320	437
Etanol (g/L)	19	24
rp (g/L·h)	0.24	0.34
-rs (g/L·h)	1.34	1.27
μ_m (h ⁻¹)	0.19	0.21
tg(h)	1.52	1.47
Y _{x/s} (g/g)	0.28	0.44
Recuento de levaduras (UFC/mL)	2.1x10 ⁹	2.7x10 ⁹
Lactosa residual (g/L)	0.81	1.72

tg tiempo de generación, Y_{x/s} rendimiento de biomasa, rp velocidad de formación de producto, -rs velocidad de consumo de sustrato.

6.6. Evaluar el efecto de la concentración de L-FE y Sulfato de amonio sobre la producción de 2-FE

6.6.1. Formulación 4 (450 mg/L de (NH₄)₂SO₄ y 1000 g/L de L-fenilalanina (L-FE) en LD).

La concentración de (NH₄)₂SO₄ en estas cinéticas (450 mg/L), tuvo un efecto sobre la producción de 2-FE. La producción máxima de 2-FE fue de 780 mg/L a las 96 h (Tabla 17). Los cromatogramas (Figura 35) muestran las señales del compuesto 2-FE (96 h), en un tiempo de retención de 10.45, 10.42 min. Mientras que la velocidad de formación de producto (rp) fue de 0.72 g L⁻¹ h⁻¹, con un coeficiente de correlación (R²) de 0.90. El consumo de lactosa fue del 99.36 %. Utilizando la ecuación de Monod obtuvimos una velocidad de consumo de sustrato (-rs) de 1.07 g L⁻¹ h⁻¹ (R²=0.99) con un contenido de lactosa residual de 0.30 g/L (96 h)(Figura 37).

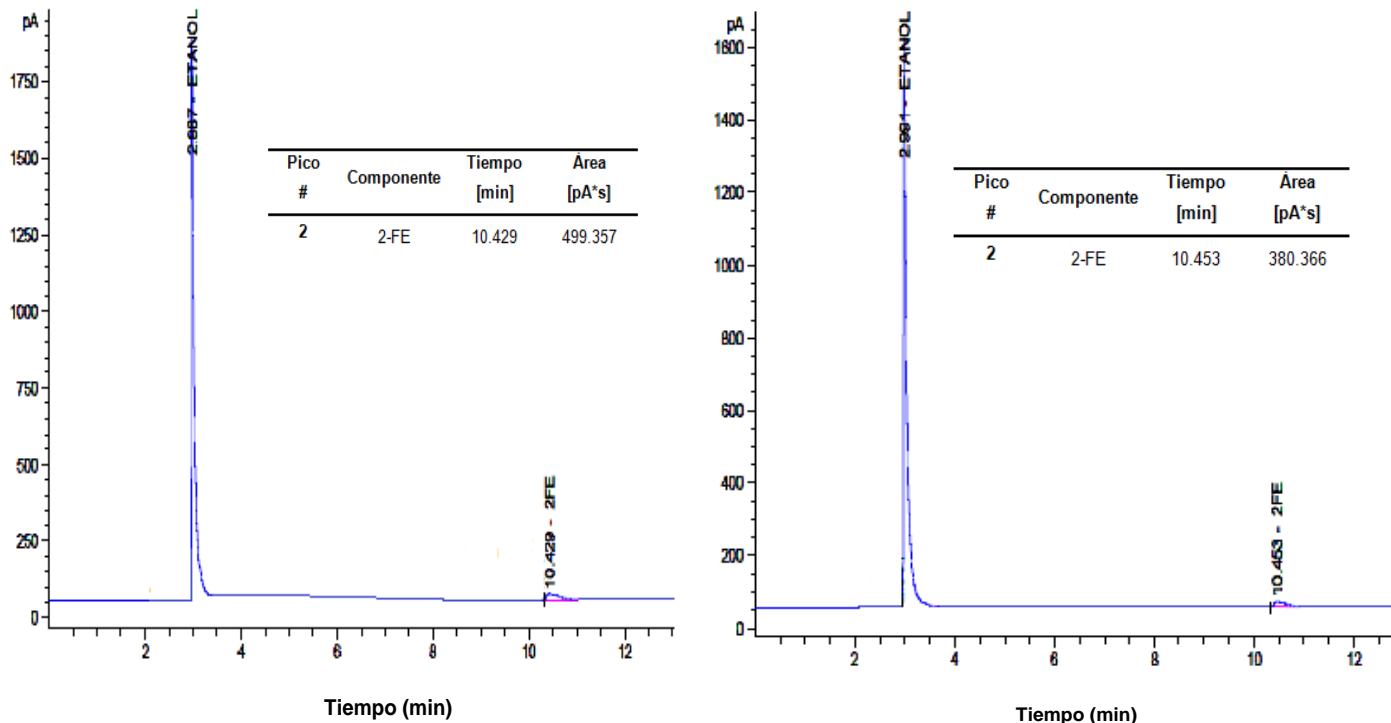


Figura 28. Cromatogramas (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 96 h en LD con 450 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a 30 °C/180 rpm.

Estos resultados corresponden al contenido de lactosa presente a lo largo de las fermentaciones. Se observó un crecimiento exponencial, con una concentración máxima de 2.19×10^9 UFC/mL (72 h). La velocidad específica de crecimiento (μ) fluctuó de 0.58 a 0.02 h^{-1} ; con un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de 0.30 g/g. Los resultados obtenidos con la ecuación de Monod, para la formación del producto asociada al crecimiento, sugieren como se demuestra en apartados anteriores, que 2-FE se encuentra asociado al crecimiento. Los valores de la ecuación de Monod fueron de $0.03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de (R^2) 0.96.

Tabla 7. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con *K. marxianus* con 450 mg/L (NH₄)₂SO₄ y L-FE a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de células (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	50.15 ± 0.713	1.06 x10 ⁷ ± 1.02x10 ⁶	ND
24	261 ± 0.095	34.25 ± 0.839	1.73x10 ⁸ ± 1.2 x10 ⁷	ND
48	508 ± 0.061	8.52 ± 0.360	2.97 x10 ⁸ ± 1.2 x10 ⁸	16.80 ± 1.31
72	669 ± 0.066	1.31 ± 0.213	2.19 x10 ⁹ ± 9.9 x10 ⁷	23.87 ± 1.96
96	780 ± 0.024	0.304 ± 0.088	1.95x10 ⁹ ± 3.4x10 ⁸	22.69 ± 0.76

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado

Utilizando las ecuaciones de los modelos de crecimiento sigmoideal Gompertz, Richards y Logístico, se obtuvieron velocidades máximas de crecimiento (μ_m) de 0.094, 0.097 y 0.076 h⁻¹, respectivamente. Los tiempos de generación obtenidos (tg) fueron de 3.20, 3.08 y 4.22 h (Figura 36). Tanto los resultados de la ecuación de Monod, como los de tg, concuerdan con los resultados obtenidos sobre la producción de 2-FE. Demostrando que a mayor tiempo de generación, se requiere un mayor tiempo en la formación de 2-FE, como podemos observar en la Tabla 17.

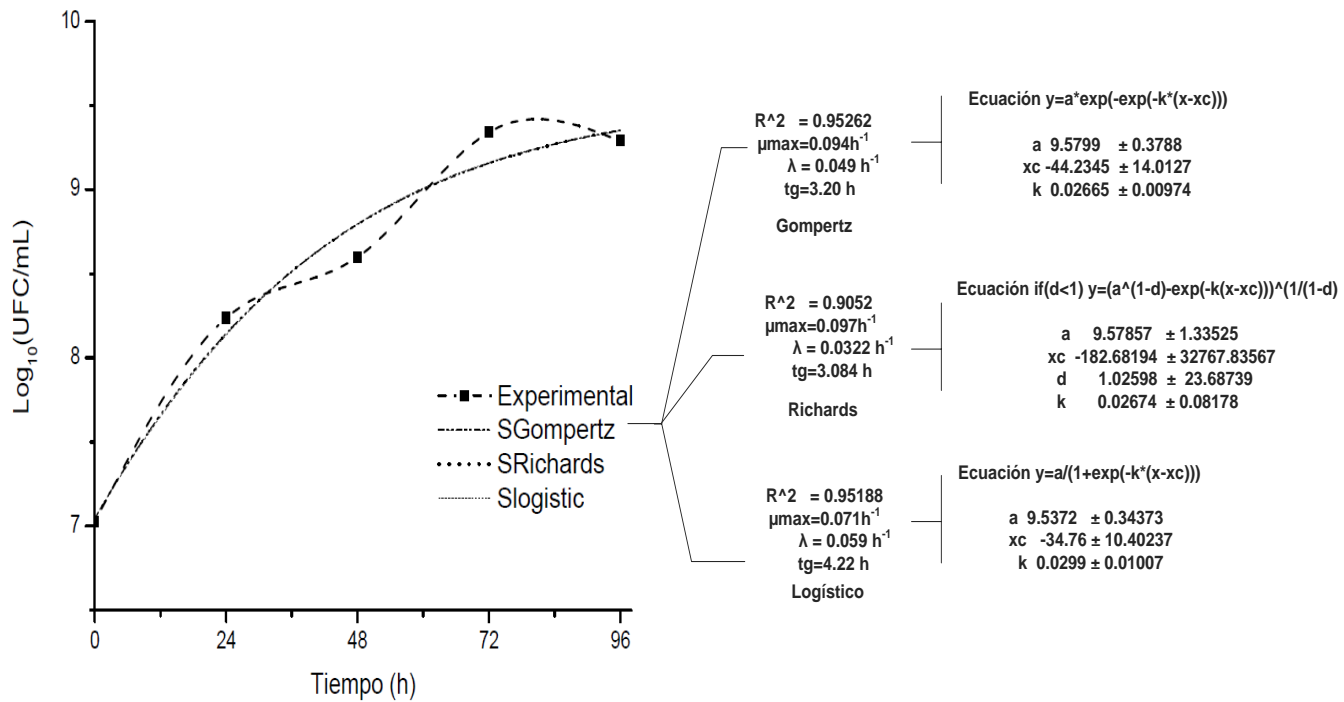


Figura 29. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las fermentaciones de LD con 450 mg/L $(NH_4)_2SO_4$ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

La producción máxima de etanol fue de ~24 g/L, los resultados de la ecuación de Monod demuestran una inhibición por producto (r_g) para etanol de $1.37 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un $K_{obs}=0.28$; $n= 0.5$ y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99 (Figura 38). Mientras que para 2-FE la $r_g=0.96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $K_{obs}=0.69$ y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99. **Rong et al. (2011)**, reportaron que concentraciones de etanol alrededor de 25 g/L, inhiben la producción de este compuesto aromático.

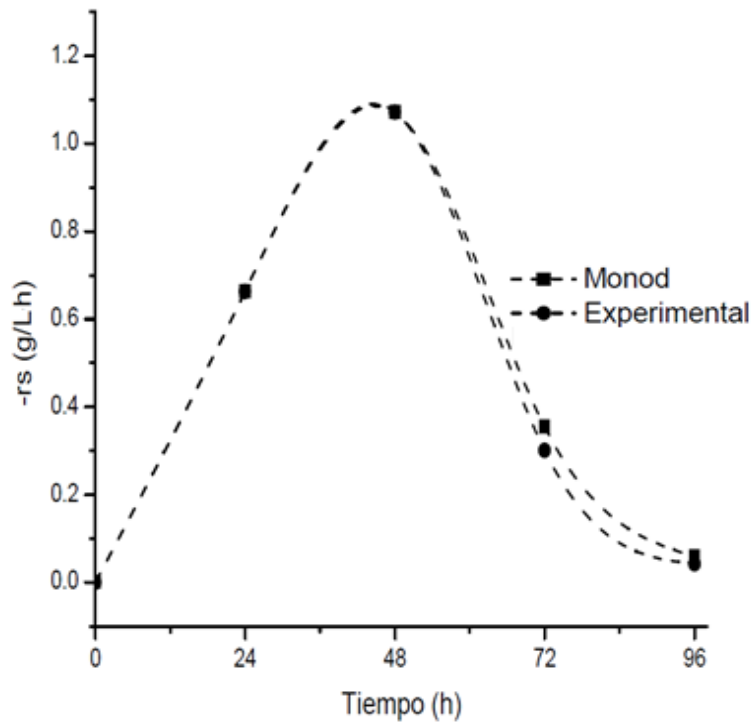


Figura 30. Velocidad de consumo de sustrato ($-rs$) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de LD con 450 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

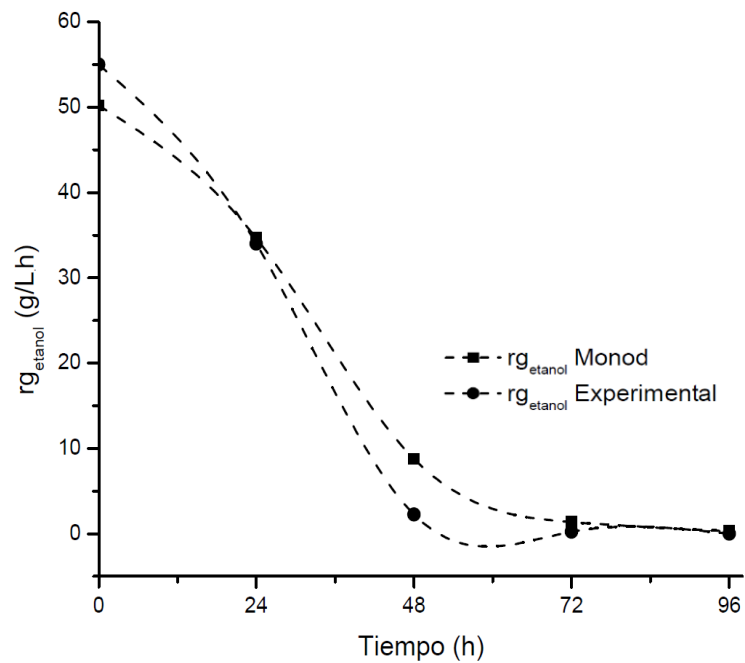


Figura 38. Ajuste de la ecuación de Monod (rg etanoh) para las cinéticas de LD con 450 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

6.6.2. Formulación 5 (900 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1000 mg/L de L-fenilalanina (L-FE) en LD).

La variación de los diferentes parámetros, 2-feniletanol, lactosa, recuento de células y etanol, a lo largo de las fermentaciones de **lactosuero dulce**, se muestran en la Tabla 18. La producción máxima de 2-FE, se obtuvo a las 48 h, con una concentración de 995 mg/L. Estos resultados fueron superiores que los obtenidos con 450 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, lo que puede deberse, principalmente a la disponibilidad de NFA. Utilizando la ecuación del modelo de Monod, se obtuvo que la velocidad de formación de producto (rp) para 2-FE de $1.14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99. Los resultados de velocidad de formación de producto (rp) son superiores que los obtenidos en las cinéticas con 450 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con valores de $0.72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (rp).

Tabla 8. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con *K. marxianus* a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de levaduras (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	54.08 ± 1.72	$5.97 \times 10^6 \pm 9.7 \times 10^6$	ND
24	775 ± 0.085	23.72 ± 1.92	$3.02 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^8$	8.13 ± 2.91
48	995 ± 0.076	0.912 ± 0.087	$1.12 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^8$	7.38 ± 1.73
72	890 ± 0.134	0.820 ± 0.190	$8.83 \times 10^8 \pm 3.5 \times 10^8$	13.83 ± 2.83
96	727 ± 0.075	0.454 ± 0.218	$7.33 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^8$	10.54 ± 2.06

Valor \pm desviación estándar ; ND: no detectado

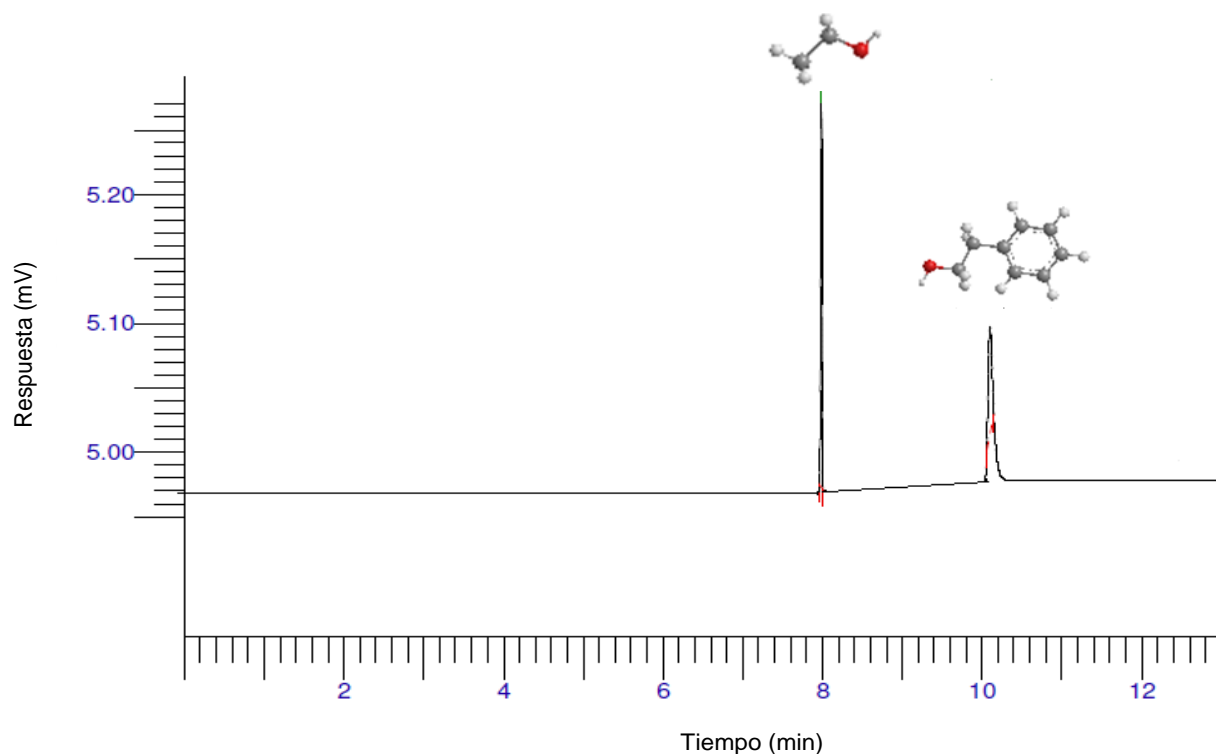


Figura 39. Cromatograma (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD con 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a 30 °C/180 rpm.

Además del análisis por cromatografía de gases, las muestras se analizaron mediante RMN al ser ésta formulación, donde se obtuvo la máxima concentración de 2-feniletanol. En el espectro de protón del compuesto aromático 2-FE del lactosuero dulce (LD) (Figura 40), se observó la señal correspondiente al disolvente de referencia, cloroformo deuterado (CDCl_3) a 7.26 ppm. Las señales que aparecen de 7.15 a 7.35 ppm (zona donde aparecen los hidrógenos de anillos aromáticos), se encuentran los hidrógenos unidos al 2-

hidroxietilo. Mientras que las señales que aparecen en 3.87 (CH₂-AR) y 2.88 (CH₂-OH), corresponden a los hidrógenos unidos a metilenos unidos a un hidroxilo (H-C-OR).

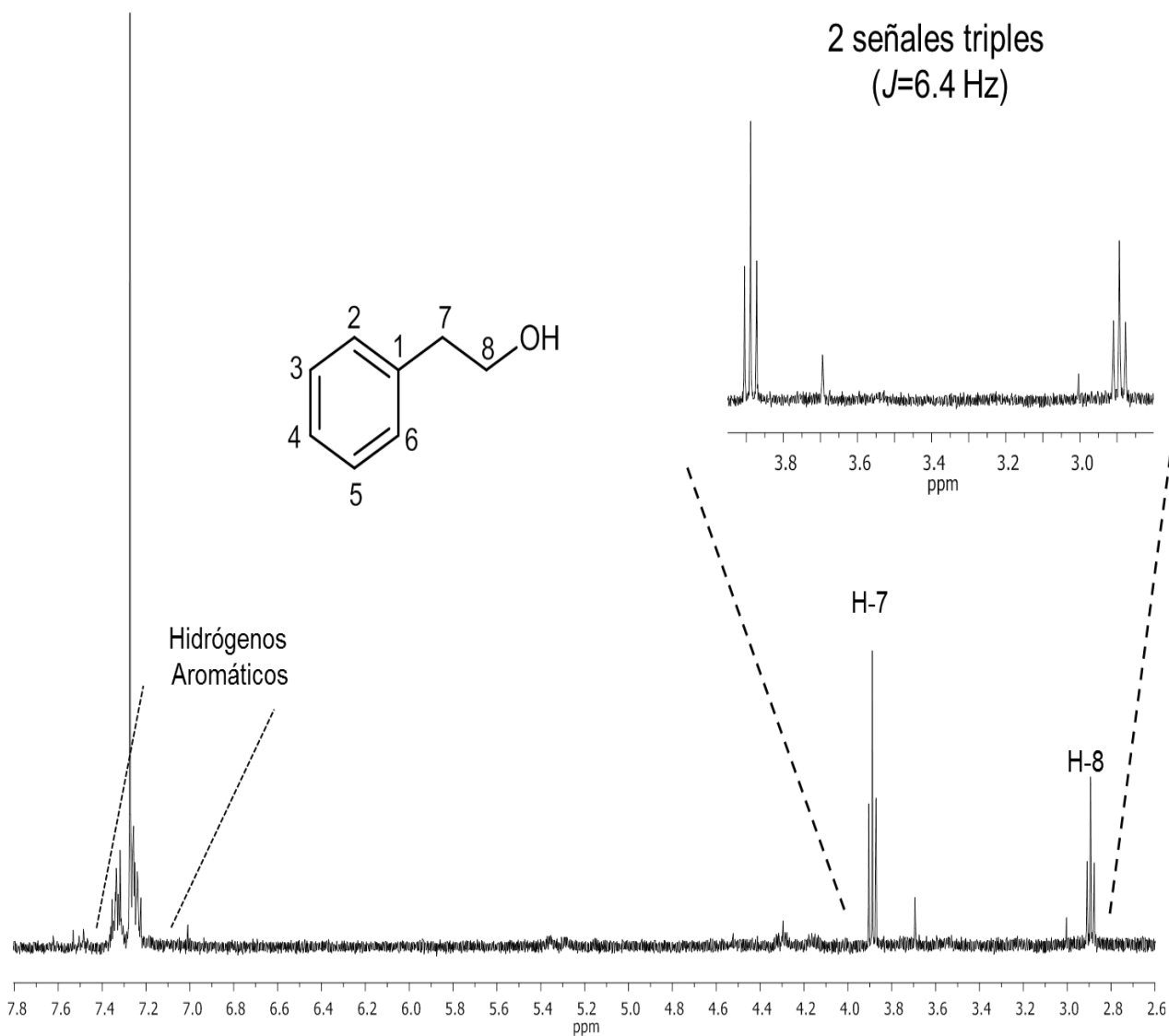


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del compuesto 2-FE en cinéticas de LD con 900 mg/L (NH₄)₂SO₄ y L-FE a 30 °C/180 rpm.

Ratanapariyanuch *et al.* 2011, obtuvieron el espectro de RMN de protón del compuesto 2-FE en vinaza con la adición del compuesto (Figura 41). Como podemos observar en el espectro, también se observan señales características de 7.15 a 7.35 ppm, que corresponden a los hidrógenos aromáticos, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Mientras que las señales presentes entre 3.87 (CH₂-AR) a 2.88 (CH₂-OH), corresponden a los hidrógenos unidos a metilenos unidos a un hidroxilo (H-C-OR).

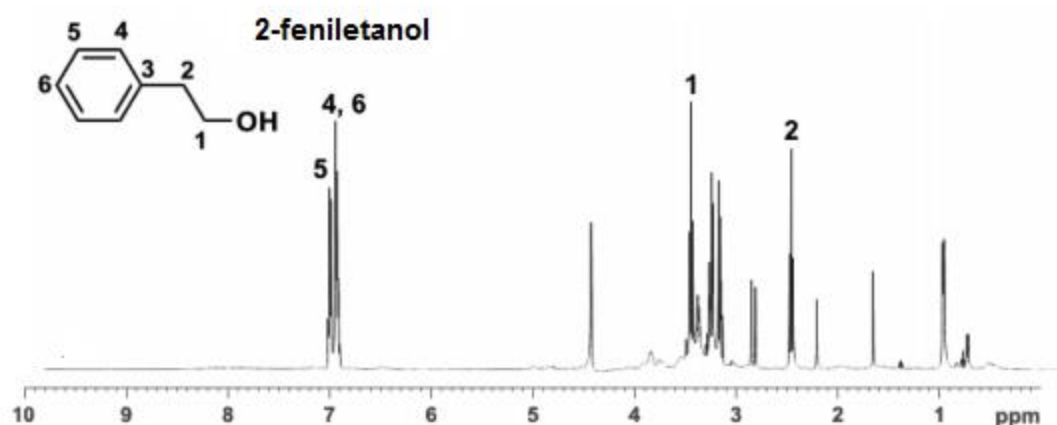


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 500 MHz en DMF del compuesto 2-FE en cinéticas de vinaza .

Adicionalmente a este reporte, se realizó la simulación del compuesto 2-FE utilizando el software Chemdraw (Figura 42). Las señales que aparecen de 7.19 a 7.23 ppm (zona donde aparecen los hidrógenos de anillos aromáticos), se encuentran los hidrógenos unidos al 2-hidroxietilo. Mientras que las señales que aparecen en 4.58 (CH₂-AR) y 2.87 (CH₂-OH) corresponde a los hidrógenos unidos a metilenos. Estas señales concuerdan con las obtenidas en las muestras analizadas para estas cinéticas.

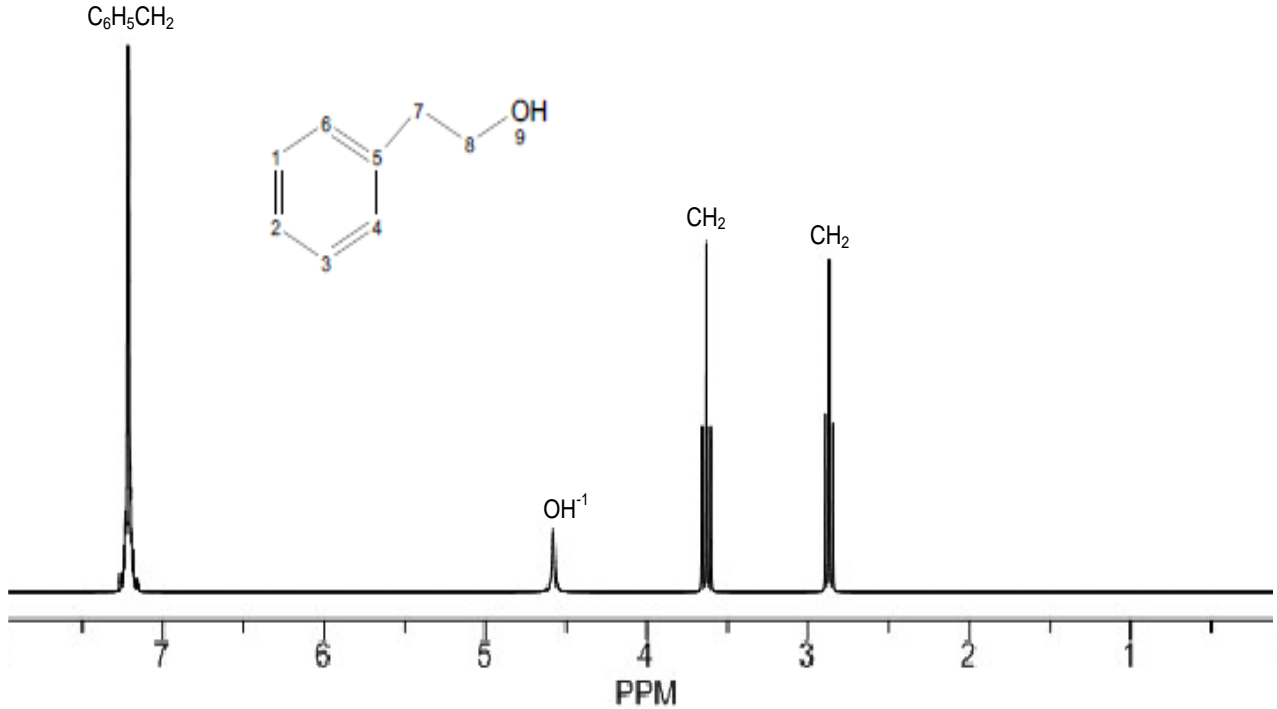


Figura 33. Espectro calculado con el software Chemdraw de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 2-FE.

Además de 2-FE, la formación de etanol estuvo presente a lo largo de las fermentaciones, con una concentración máxima de 13.83 g/L (72 h). A un tiempo de 96 h, la concentración de 2-FE y de etanol, así como el recuento de células, presentaron un decremento con valores de 3.13×10^8 UFC/mL, 727 mg/L y 10.54 g/L, respectivamente. El ajuste de la ecuación de Monod para la inhibición por producto, nos dio como resultado una velocidad de crecimiento (r_g) para etanol de $0.85 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con una constante (K_{obs}) de 0.11 y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.97 que se calculó de la siguiente manera:

$$r_g = k_{obs} \frac{\mu_m C_s C_x}{K_s + C_s} \quad (4)$$

$$k_{obs} = \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^n \quad (5)$$

Para 2-FE, se obtuvo una rg de $0.55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una K_{obs} de 0.64, el coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.99 (Figura 43). Estos resultados nos revelan que concentraciones por encima de 14 g/L de etanol y 1 g/L de 2-FE, presentes en el medio pueden ser inhibitorias para la levadura en esta investigación. Este comportamiento es similar al descrito por **Wang et al. (2011)**, quienes reportaron el efecto sinérgico inhibitorio entre la formación de etanol y 2-FE para *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de 10 y 2.7 g/L , respectivamente. Se ha reportado que el efecto inhibitorio de estos metabolitos, incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática, afectando los sistemas de transporte para azúcares y aminoácidos, acelerando la difusión pasiva de iones y metabolitos a través de esta (**Seward et al., 1996; Fang y Daugulis, 2009**).

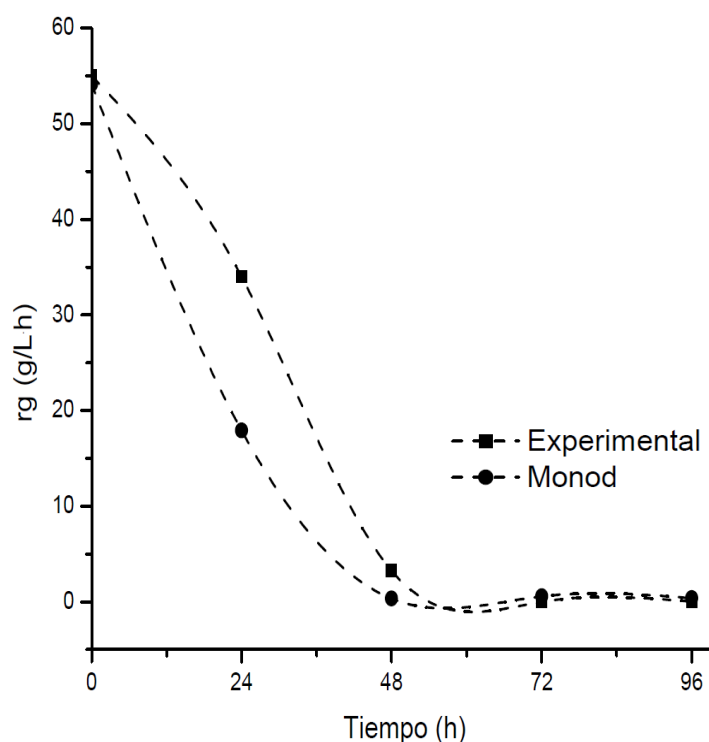


Figura 34. Ajuste del modelo de Monod para la inhibición por producto de las fermentaciones de lactosuero dulce con 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y L-FE a pH 4.8, $30 \text{ }^\circ\text{C}/180 \text{ rpm}$.

La velocidad específica de crecimiento (μ) en estas fermentaciones, utilizando el ajuste del modelo de Monod, fluctuó de 0.82 a 0.01h⁻¹. Utilizando los modelos de crecimiento sigmoideal Gompertz, Richards y Logístico, se obtuvieron tiempos de generación (tg) de 1.07, 1.11 y 1.50 h, (Figura 44). El crecimiento obtenido, determinado por el tiempo de generación para los tres modelos (tg 1.07, 1.11 y 1.50 h) es más rápido, que el reportado por **Mendoza et al. (2006)**, quienes obtuvieron un tg de 1.65 h en lactosuero desproteinizado.

El recuento de células presentó un crecimiento exponencial, con una concentración máxima de 1.12x10⁹ UFC/mL a las 48 h, estos resultados reflejan la afinidad de la cepa nativa (asilada de *agave durangensis*) de *K. marxianus* por el sustrato propuesto. Se obtuvo un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de 0.22 g/g. Estos resultados, son menores que los obtenidos en las cinéticas con 450 mg/L de (NH₄)₂SO₄ (0.30 g/g), con un recuento celular de 2.19 x10⁹ UFC/mL.

Utilizando el ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico, las velocidades máximas de crecimiento (μ_m) obtenidas, a partir de las constantes de cada modelo, fueron 0.28, 0.27 y 0.20 h⁻¹, respectivamente. Obteniendo un mejor coeficiente de correlación (R^2 0.98) para el modelo de Richards (Figura 46). Estos valores de μ_m concuerdan con lo reportado por **Araujo et al. (2007)**, que obtuvieron una μ_m de 0.29 h⁻¹. Sin embargo, se encuentran por debajo de lo reportado por **Lukondeh et al. (2003)**, en cultivo por carga (0.37 h⁻¹) en un medio sintético con una concentración de lactosa de 40 g/L. Estas diferencias podrían deberse a la complejidad del sustrato empleado en esta investigación y a las condiciones del ensayo.

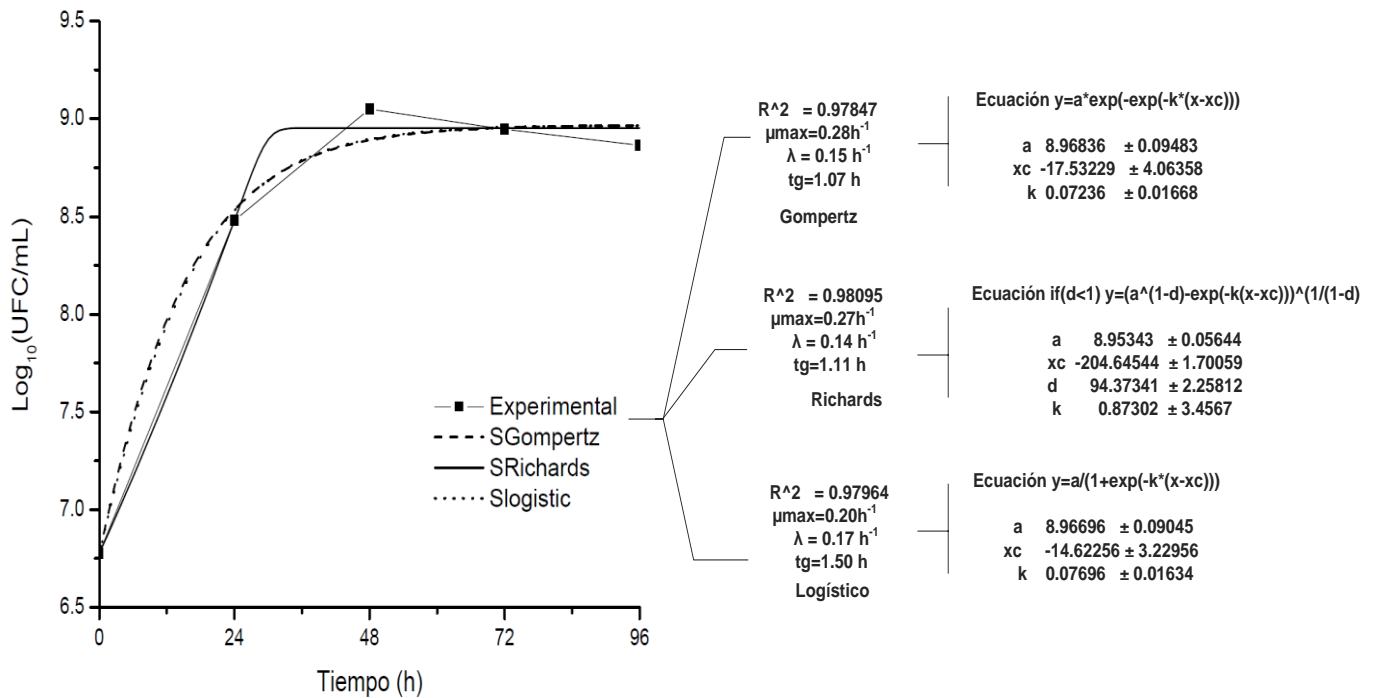


Figura 35. Ajuste del modelo Gompertz, Richards y Logístico para las cinéticas de LD con 900 mg/L (NH₄)₂SO₄ y L-FE a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Se obtuvo una remoción de lactosa del 99.10 % a las 96 h. Éstos resultados, podrían deberse principalmente, al suplemento con sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), que aporta el ion amonio a las levaduras (*K. marxianus*) y al ajuste de pH a 4.8, ya que se ha reportado que un pH óptimo (~4.7) en el sustrato, tiene un efecto sobre la absorción de la lactosa en el gen LAC12 (Km para lactosa de ~ 2,8 mM), que es uno de los dos genes responsables de la hidrólisis de lactosa, hasta sus monómeros glucosa y galactosa con *K. marxianus* (Texeira et al., 2006; Paladino et al., 2004).

6.6.3. Formulación 6 (1350 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1000 mg/L de L-fenilalanina (L-FE) en LD)

La máxima producción de 2-FE en estas cinéticas fue de 718 mg/L a las 48 h. La máxima producción se obtuvo en tiempos similares que en las cinéticas con 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (apartado 6.1.3.). Sin embargo, la concentración se encuentra por debajo de lo obtenido con este tratamiento. La velocidad de formación de producto (rp) fue de $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de (R^2) de 0.98. Estos resultados fueron menores que los obtenidos en las cinéticas, tanto con 450 como de 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que se explican en los apartados 6.1.2 y 6.1.3. Para estas cinéticas, rp, concuerda con la concentración de 2-FE obtenida (Tabla 19).

Tabla 9. Concentración de los distintos parámetros de las fermentaciones de lactosuero dulce con *K. marxianus* con 1350 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 30 °C/180 rpm.

Tiempo (h)	2-feniletanol (mg/L)	Lactosa (g/L)	Recuento de células (UFC/mL)	etanol (g/L)
0	ND	48.86 ± 0.919	1.2x10 ⁷ ±4.1 x10 ⁴	ND
24	398 ± 0.200	36.14 ± 1.612	1.7x10 ⁸ ± 8.2x10 ⁶	5.86 ± 2.94
48	718 ± 0.004	3.63 ± 0.315	3.4x10 ⁸ ± 7.4x10 ⁷	22.89 ± 2.66
72	662 ± 0.039	1.88 ± 0.068	2.4x10 ⁹ ± 2.9x10 ⁷	23.32 ± 2.56
96	628 ± 0.088	0.70 ± 0.134	1.4x10 ⁹ ± 3.0x10 ⁷	25.13 ± 0.37

Valor ± desviación estándar

ND: no detectado.

Los cromatogramas a este tiempo (48 h) se muestran en las Figura 45. La señal del compuesto se detectó en tiempos de retención de 10.457, 10.359 y 10.397 min. Las áreas determinadas por CG/FID para estos tiempos fueron de 441.151, 433.68 y 413.723 pa s⁻¹, respectivamente.

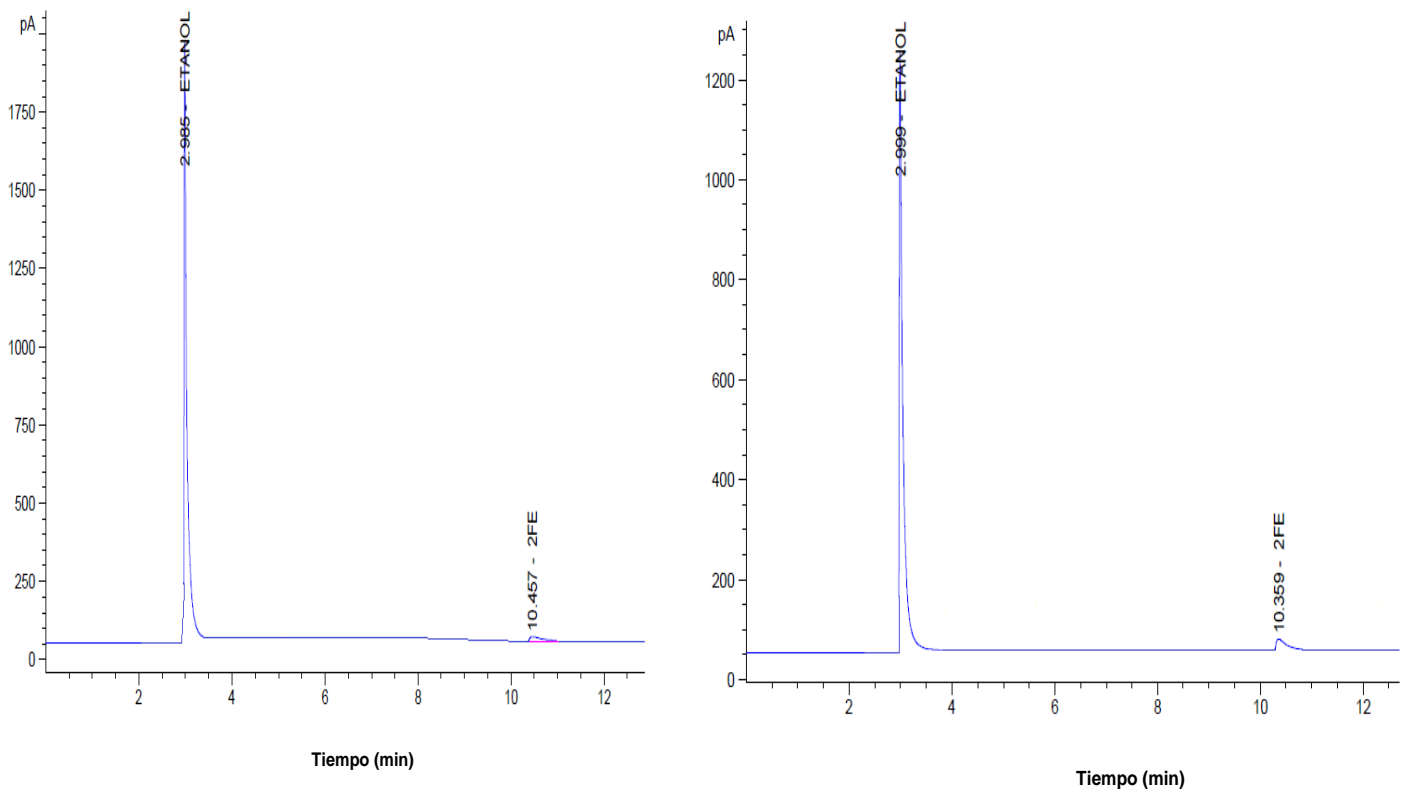


Figura 36. Cromatogramas (CG/FID) del compuesto 2-FE a las 48 h en LD con 1350 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

La velocidad de consumo de sustrato ($-r_s$) obtenido con la ecuación de Monod fue de $1.35 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.99$), con un contenido de lactosa residual de 0.70 g/L (Figura 46). Estos resultados son superiores que los obtenidos con 450 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, lo que implica una mayor concentración celular. La concentración máxima de levaduras fue de $2.4 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$. Se obtuvo un rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$, en base a lactosa) de 0.42 g/g . Estos resultados son superiores que los obtenidos, tanto en las cinéticas con 450 como con 900 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0.22/ 0.30 \text{ g/g}$) (Tabla 19).

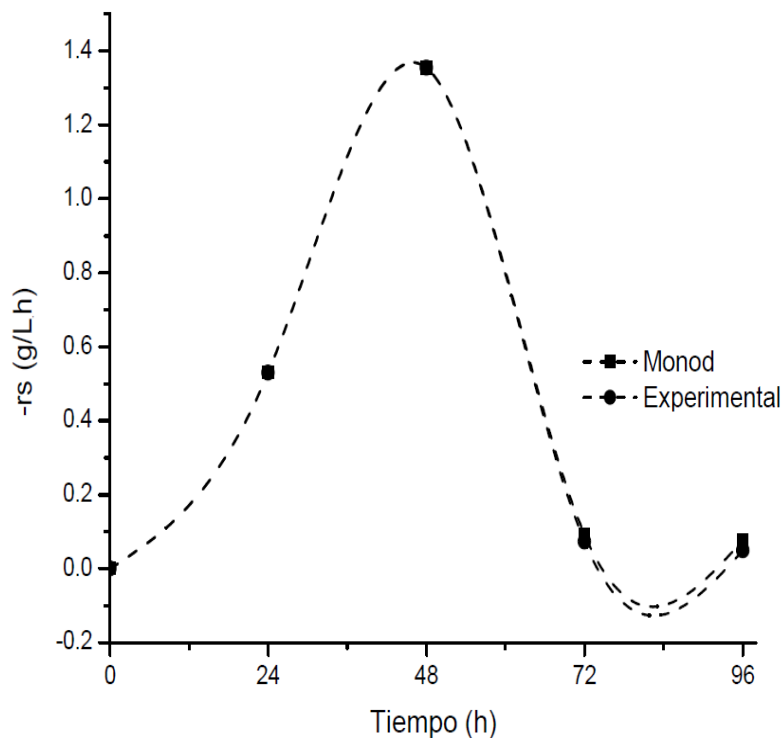


Figura 46. Velocidad de consumo de sustrato (-rs) utilizando la ecuación de Monod en las cinéticas de LD con 1350 mg/L (NH₄)₂SO₄ a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

Utilizando el ajuste de los modelos Gompertz, Richards y Logístico, las velocidades máximas de crecimiento (μ_m) obtenidas, a partir de las constantes de cada modelo, fueron 0.11, 0.098 y 0.082 h⁻¹, respectivamente. Obteniendo un mejor coeficiente de correlación (R^2 0.95) para el modelo de Gompertz. Se ha reportado que la adición de sales de amonio en exceso al medio de cultivo, genera una disminución en la producción de alcoholes superiores (**Giudici et al., 1990**), lo que podría explicar los resultados obtenidos. La concentración máxima de etanol obtenida fue de 25.13 g/L (96 h). Estas concentraciones resultaron ser inhibitorias, tanto en la concentración de biomasa, como en la formación de 2-FE. Utilizando la ecuación de Monod se obtuvo para etanol una $r_g=1.99$ g L⁻¹ h⁻¹; $n=0.5$; $K_{obs}=0.32$ con un coeficiente de correlación de 0.99. Mientras que para 2-FE, la r_g fue de 1.42 g L⁻¹ h⁻¹; $n=0.2$; $K_{obs}=0.70$ y un coeficiente de correlación de 0.99.

El efecto sinérgico entre etanol y 2-FE se observó en estas cinéticas como se ha reportado (**Seward et al., 1996; Fang y Daugulis, 2009**). Finalmente, en la Tabla 20 se muestran los parámetros determinados en cada tratamiento, destacando el tratamiento en donde adicionamos 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1g/L de L-fenilalanina. Para este tratamiento se obtuvo una mayor concentración de 2-FE (995 mg/L) en menor tiempo (48 h). Una mayor velocidad de formación de producto (rp), una velocidad intermedia de consumo de sustrato (-rs).

Tabla 20. Tabla comparativa de resultados de las cinéticas en LD con 450,900 y 1350 mg/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

Parámetros	450	900	1350
2-FE(mg/L)	780	995	718
Etanol (g/L)	24	14	25.13
rp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.72	1.14	0.32
-rs (g L ⁻¹ h ⁻¹)	1.07	1.26	1.35
μ_m (h ⁻¹)	0.098	0.27	0.11
tg(h)	3.20	1.11	2.75
Y _{x/s} (g/g)	0.30	0.22	0.42
Recuento de levaduras (UFC/mL)	2.19X10 ⁹	1.12X10 ⁹	2.4X10 ⁹
Lactosa residual (g/L)	0.30	0.45	0.70

tg tiempo de generación, **Y_{x/s}** rendimiento de biomasa, **rp** velocidad de formación de producto, **-rs** velocidad de consumo de sustrato

Adicionalmente, se obtuvo una concentración más baja de etanol (14 g/L), que no resultó inhibitoria como en el tratamiento con 1350 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A pesar de que en todos los tratamientos hubo producción de 2-FE. Cuando adicionamos 450 y 1350 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la producción fue orientada principalmente a la producción de etanol y de biomasa. Estos resultados no son convenientes para lo que buscamos, por lo que se concluye que el mejor tratamiento es cuando adicionamos 900 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hasta esta parte experimental. Para el tratamiento donde obtuvimos la máxima concentración de 2-FE (~ 1 g/L), realizamos un análisis de costos de la materia prima (Figura 47).

Consideramos, que se ha reportado que el costo de 2-FE obtenido a partir del uso de microorganismos es de 1000 dólares el kilogramo (**Etschmann *et al.*, 2006**).

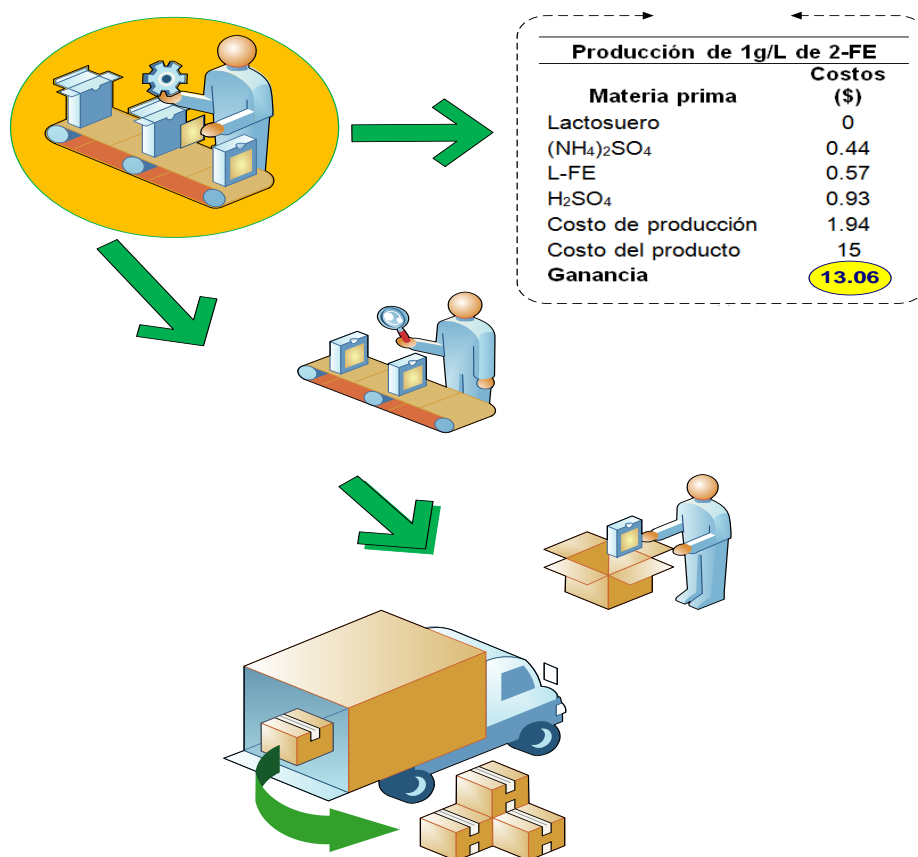


Figura 47. Análisis de costos de materia prima para las cinéticas de LD con 900 mg/L (NH₄)₂SO₄ a pH 4.8, 30 °C/180 rpm.

6.5. Evaluar el efecto de la producción de 2-FE sobre la reducción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Todos los tiempos en cada tratamiento (F1, F2, F3, F4, F5 y F6), se analizaron para determinar la demanda química de oxígeno (DQO). Para los tratamientos con mayor remoción, se realizó un análisis de reducción de costos,

empleando nuestro tratamiento, los montos se tomaron considerando la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua (2007).

Las eficiencias de remoción para los tratamientos mostrados en las Tablas 20 y 21 se calcularon de la siguiente manera:

$$E = \left(\frac{S_0 - S}{S_0} \right) * 100$$

Donde:

E: Eficiencia de remoción del sistema

S: Carga conta min ante de salida (mg DQO, DBO₅ o SST/L)

*S*₀: Carga conta min ante de entrada (mg DQO, DBO₅ o SST/L)

Para los tratamientos mostrados en la Tabla 22, la eficiencia máxima de remoción (E) fue en la **formulación 3**, con un 97.58%. Para las formulaciones 1, 2 y 4 se obtuvieron E de 68.22, 87.72 y 70.97 %, respectivamente. En las Figuras 48 y 49, se muestran las imágenes del análisis colorimétrico de las cinéticas de la formulación 3 .

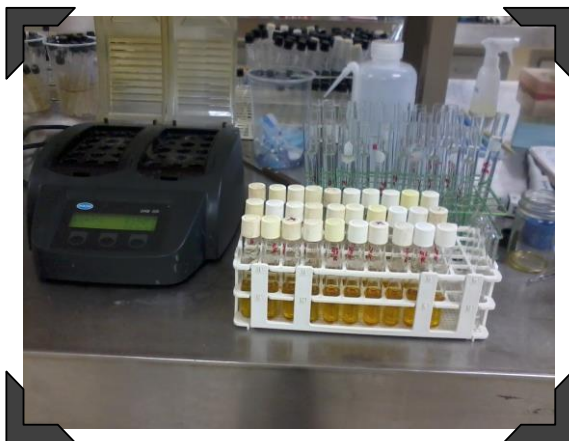


Figura 48. Muestras preparadas de acuerdo a la APHA,2005 para el análisis colorimétrico



Figura 49. Muestras de la cinéticas de LD después del tratamiento

Para las formulaciones 2 y 3, se realizó un análisis de reducción de costos, considerando un **cuerpo receptor “A”** (Rios, Aguas costeras, Suelo), estipulado en la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua, publicado en el Diario Oficial de la Federación (2007). Para este tipo de agua, se establece un límite máximo permisible para DQO de 320 mg/L, como promedio mensual. El exceso en el límite máximo permisible, genera una cuota en pesos por kilogramo de contaminante al trimestre de \$0.2953 para DQO, en el cuerpo receptor **tipo “A”**. El monto del contribuyente se estipula será pagado en términos del artículo 283 de la ley antes mencionada.

Tabla 10. Tabla comparativa de la concentración de la DQO en las cinéticas de LD a 0, 450, 900 y 1350 mg/L de (NH₄)₂SO₄ a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

T	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
Condiciones	Agitación 180 rpm pH 4.8	Agitación 180 rpm pH 4.8	Agitación 180 rpm pH 4.8	Agitación 180 rpm pH 4.8
		450 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g/L L-FE	900 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g/L L-FE	1350 mg/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g/L L-FE
Tiempo (h)	DQO (mgO₂/L)	DQO (mgO₂/L)	DQO (mgO₂/L)	DQO (mgO₂/L)
0	51,833 ± 3790.96	41,388 ± 994.32	50,583 ± 3033.21	37,027 ± 622.58
24	22,472 ± 273.57	15,388 ± 947.70	16,694 ± 569.04	18,027 ± 2793.42
48	19,055 ± 106.38	14,027 ± 662.60	11,888 ± 387.56	14,250 ± 1631.33
72	18,222 ± 115.64	11,916 ± 337.55	6,500 ± 804.43	13,694 ± 1817.48
96	16,472 ± 277.31	5,083 ± 1184.063	1,222 ± 45.36	10,750 ± 1784.34

Valor ± desviación estándar

T: tratamiento

Gómez et al. (2009), realizaron un estudio en el Valle de Tulancingo; dividieron a los productores en función a la leche procesada, clasificándolos en a) industrias pequeñas, aquellas que procesan hasta 3,000 litros de leche por día; b) industrias medianas, entre 3,001 y 9,000 litros por día; c) industrias grandes, con más de 9,000 litros de leche por día. En este trabajo experimental consideramos la clasificación b.

Así tenemos que para la fomrulación 3 la reducción de costos sería de un 97.58 %. Mientras que para la formulación 2, la reducción sería de un 87.70 %. En la Figura 50 se muestra el análisis de costos en donde se establece un monto a pagar con tratamiento de \$6,773,201.

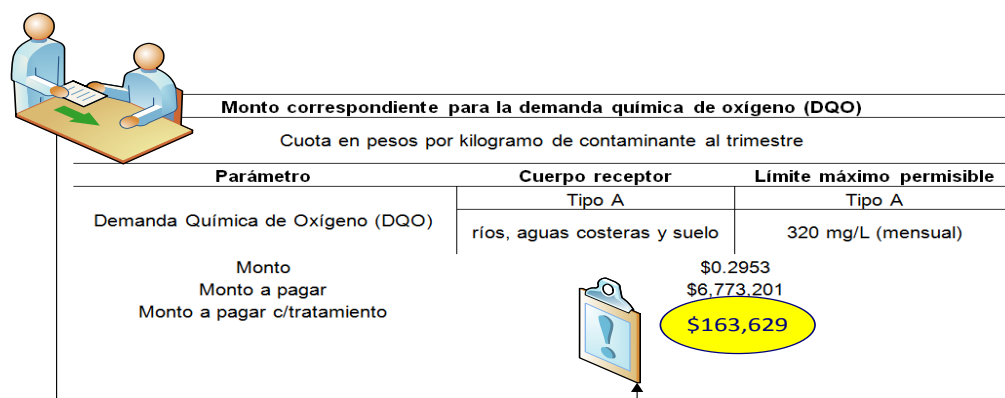


Figura 370. Análisis de reducción de costos para la formulación 3 de las cinéticas de LD a pH 4.8 30°C/180 rpm.

La Figura 51, muestra el análisis de reducción de costos para la formulación 2, donde se establece un monto a pagar con el tratamiento de \$5,541,966.

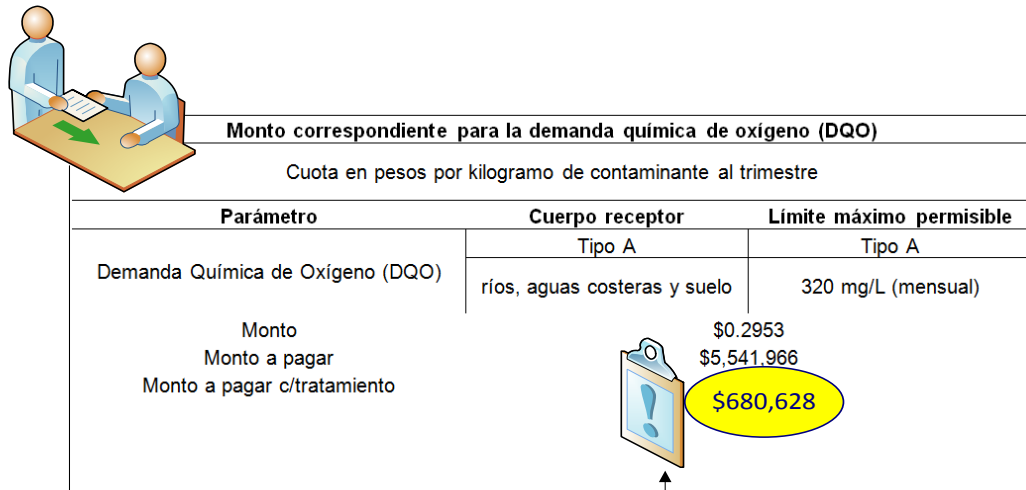


Figura 381. Análisis de reducción de costos para el tratamiento C de las cinéticas de LD a pH 4.8 30°C/180 rpm.

Para las formulaciones 5 y 6, la eficiencia de remoción (E) máxima fue de 76.61 y 67.69 %, respectivamente. En la Tabla 23, se muestran los resultados de las cinéticas donde adicionamos 500 y 1000 g/L de L-fenilalanina. Observamos que las concentraciones fluctuaron de 37,889 a 8,861 mgO₂/L de la DQO para la formulación 5. Mientras que para la formulación 6 la concentraciones de la DQO fluctuaron de 38,000 a 12,277 mgO₂/L.

Tabla 11. Tabla comparativa de la concentración de la DQO en las cinéticas de LD con 0.5 y 1 g/L de L-FE a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

T	Formulación 5	Formulación 6
	Agitación 180 rpm	Agitación 180 rpm
Condiciones	pH 4.8 0.5 g/L L-FE	pH 4.8 1 g/L L-FE
Tiempo (h)	DQO (mgO₂/L)	DQO (mgO₂/L)
0	37,889 ± 2077.70	38,000 ± 2320.51
24	19,666 ± 1083.92	21,055 ± 2025.81
48	14,555 ± 1095.25	15,194 ± 1019.73
72	9500 ± 491.70	14,833 ± 476.83
96	8,861 ± 620.92	12,277 ± 465.91

Valor ± desviación estándar

Finalmente en las Figuras 52 y 53, se muestran los análisis de costos para las formulaciones 5 y 6. Para la formulación 5, la reducción en costos fue del 76.61 %. Para este tratamiento, el monto a pagar de acuerdo a la ley en materia de aguas es de \$ 5,073,440. Mientras que para la formulación 6, la reducción de costos fue de 32.30 %, con un monto original de \$5,088,303.

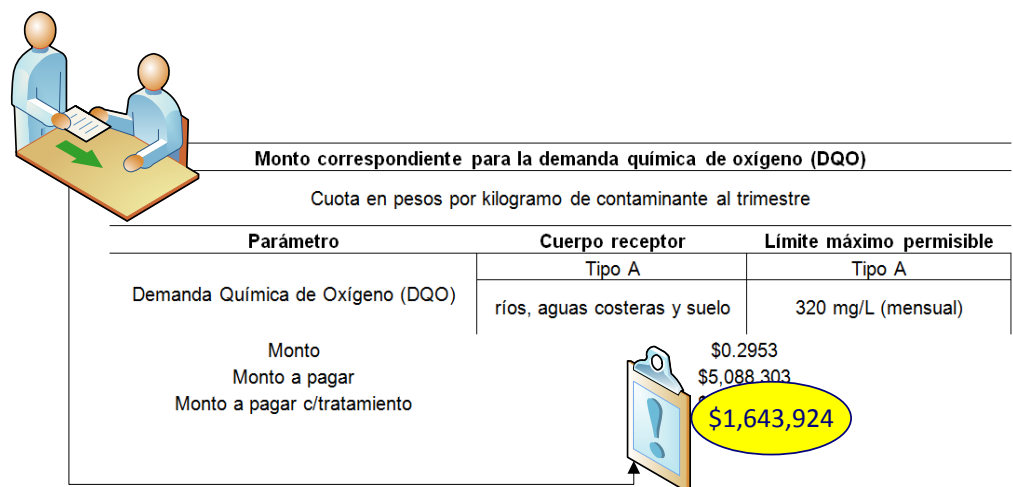


Figura 392. Análisis de reducción de costos para formulación 5 de las cinéticas de LD a pH 4.8 30 °C/180 rpm.

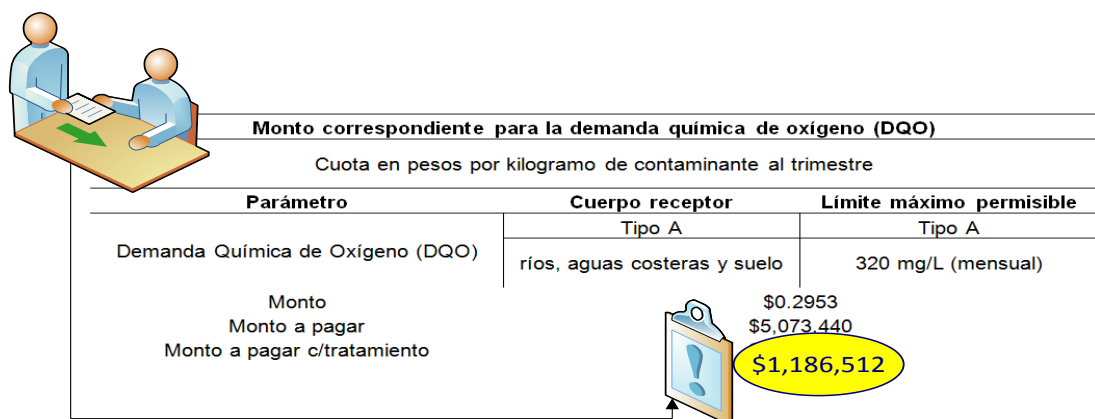


Figura 403. Análisis de reducción de costos para formulación 6 de las cinéticas de LD a pH 4.8 30 °C/180 rpm.



CONCLUSIONES

Conclusiones

- I. El análisis de RMN, así como el ajuste de los modelos matemáticos de crecimiento sigmoideal y de Monod, permitieron seleccionar el sustrato potencial (LD), que presentó diferencias en la conformación de lactosa, respecto a la concentración de β y α -lactosa, en comparación con el LA y LR, lo que además del contenido de proteína y minerales favorecieron la producción de 2-FE.
- II. Se demostró el uso potencial del LA en crudo en cinéticas en lote (batch, reactor intermitente), para la producción tanto de etanol como de biomasa, en comparación con el LD y LR.
- III. El uso de glucosa, como fuente de carbono y energía presente en el lactosuero y el uso del aminoácido L-FE como precursor, se demostró tiene un efecto sobre la producción de 2-FE en LD a ciertas concentraciones (> 500 g/L).
- IV. La disponibilidad de NFA (sulfato de amonio), combinado con el precursor L-fenilalanina, tiene un efecto significativo sobre la producción de 2-FE; sin embargo, la extracción del producto mediante técnicas IPSR con solventes adecuado a partir del momento en que se forma, podría incrementar su producción.
- V. Se demostró que la reducción de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) es independiente de la producción de 2-FE. Lo que reduce los costos en el monto establecido por la Ley en Materia de Aguas (receptor A).

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AC. Yeasts in Food and Beverages. Amparo Quirol, Graham Fleet. Alemania ; 2006. pp 285-334.

Achmon Y, Zelas Z & Fishman A. Cloning *Rosa hybrid* phenylacetaldehyde synthase for the production of 2-phenylethanol in a whole cell *Escherichia coli* system. Appl Microbiol Biotechnol 2013; DOI 10.1007/s00253-013-5269-z

Adam AC, Rubio Texeira M, Polaina J. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004, 44: 553-557.

Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, Pandey A, Banat MI & Koutinas AA. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. Food Chem 2014; 145: 710–716.

Akita O, Ida, T Obata, T & Hara S. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of β -phenethyl alcohol and β -phenethyl acetate. Journal of Fermentation and Bioengineering 1990, 69: 125-128.

Amerine M & Ough C. Methods for analysis of musts and wines. Wiley Inter Science publication. Wine and wine making. New York, USA ; 1980. pp 11-42.

Aulton ME. Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2007. pp 145-153.

Äyräpää T. The formation of phenethyl alcohol from ^{14}C labelled phenylalanine. Journal Institute of Brewing 1965, 71: 341–347.

-
- Barqueros MQ. Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. Editorial UCR;2006. pp 234-248.
- BEA (Bureau of Economic Analysis). 1992 benchmark input-output table. Washington, DC: US Department of Commerce.
- Bedoukian P. Phenyl ethyl alcohol. Perfumery and flavoring synthetics. Elsevier Publishing Co. Weinheim; 1986. pp 370–383.
- Bergada M. Diseño de catalizadores para una obtención limpia de 2-feniletanol. Universidad Rovira de Virginia; 2007. ISBN: 978-84-691-0355-5. pp 1-2.
- Berruga MI, Jaspe A, SanJose C. Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. International Biodeterioration Biodegradation 1997, 40:119-123.
- Bouamra M, Chavas JP, Cox TL & Requillart V. Partial market liberalization and the efficiency of policy reform: The case of the European dairy sector. American Journal of Agricultural Economics 2002, 4:1003-1020.
- Bouët A, Decreux Y, Fontagné L, Jean S & Laborde D. Tarrif data. In B. V. Dimaranan (Ed.), Global trade assistance and protection: The GTAP 6 data base. Center for Global Trade Analysis. Puerdue Univertsity.
- Burger M, van Oort F & Linders GJ. On the specification of the gravity model of trade: Zeros, excess zeros and zero-inflated estimation. Spatial Economic Analysis 2009, 4:167-190.
- Buzzini P; Martini A; Cappelli F; Pagnoni U & Davoli P. A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. Antoine van Leeuwenhoek 2003, 84: 301-311.
- Carvalho F, Prazeres RA & Rivas J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. Sci Total Environ 2013; 445–446: 385–396.

-
- Carrasco C A & Guerra M. Whey as a source of bioactive peptides. *Anales Venezolanos de Nutrición* 2010, 23: 42-49.
- Carrère C. Revisiting the effects of regional trade agreements on trade flows with proper specification of the gravity model. *European Economic Review* 2006, 2:223-247.
- Celińska E, Kubiak P, Bialas W, Dziadas M & Grajek W. *Yarrowia lipolytica*: the novel and promising 2-phenylethanol producer. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013; 40:389-392.
- Charteris A & Winchester N. Dairy disaggregation and joint production in a economy-wide model. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics* 2010, 54:491- 501.
- Diniz HS, Rodrigues M, Fietto GL, Passos F & Silveira W. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatal Agricul Biotechnol* 2013; 3:111-117.
- Donal V & Judith GV. *Bioquímica* 3ra edición. Editorial Médica Panamericana ; 2006. pp 456-467.
- Dragone G, Mussatto IS, Oliveira MJ & Teixeira AJ. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem* 2009; 112:929-935.
- Dragone G, Mussatto IS, Silva e AJB & Teixeira AJ. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass Bioenerg* 2011; 35: 1977-1982.
- Durham RJ & Houring JA. Waste management and co-product recovery in dairy processing. In K.Waldron (Ed.), *Waste management and co-product recovery in food processing* ; 2007. pp 332-387.

EPA, An organizational guide to pollution prevention. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory, Center for Environmental Research Information, Cincinnati, Ohio. 2003.

Etschmann MMW & Schrader J. An aqueous–organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 71: 440-443.

Etschmann MMW, Bluemke W, Sell D & Schrader J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59: 1-8.

Etschmann MMW, Sell D & Schrader J. Screening of yeast for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 531-536.

Eugene DO. Métodos ópticos de análisis. Editorial Reverté S.A. Mc Graw Hill. España; 1990. pp 234-245.

Fabre CE, Blanc PJ & Goma G. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Prog* 1998; 14:270-274.

Foegeding EA, Davis JP, Doucet D & McGuffey MK. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology* 2002; 13:151-159.

Gannoun H, Khelifi E, Bouallagui H, Touhami Y & Hamdi M. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresource Technology* 2008; 99:6105-6111.

Garavaglia J, Hickmann FS, Mara PT, Carmo PM & Záchia AM. Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 2007; 23:1273–1279.

-
- Garibay MG, Ramírez QR & Canales MLA. *Biotecnología Alimentaria*. Editorial Limusa. México; 2000. pp 196-197.
- Gavrilescu M & Chisti Y. *Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry*. *Biotechnology Advances* 2005, 23:471-499.
- Gil ZM. *Industrialización de las proteínas del lactosuero*. *Revisiones de la Ciencia. Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*. Cali, Colombia; 2007. pp 7: 3-9.
- González SMI. *The biotechnological utilization of cheese whey: a review*. *Bioresource Technology* 1996; 57:1-11.
- Graciano FG, Heinzle E, Wittmann C & Gombert KA. *The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 79:339–354.
- Guimarães MR, Teixeira AJ & Domingues L. *Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey*. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 375-384.
- Gupte AM & Nair JS. *β -galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551*. *J Sci Ind Res* 2010 ; 69: 855-859.
- Hadiyantoa, Ariyantia D, Ainia PA & Pinundia SD. *Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus**. *Energy Procedia* 2014; 47: 108-112.
- Holland B, Yazdi SR, Titapiccolo GI & Corredig M. *Separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography*. *J Dairy Sci* 2010; 93:893-900.
- Hough JH. *New opportunities for astronomical polarimetry*. *J Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 2007; 106:122-132.

Huang C; Lee S & Chou C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. Food Research International 2001; 34: 277-282.

INPA, 2009. Bulletin of the International Dairy Federation 438:100.

Janssens L, De Pooter H, Vandamme E & Schamp N. Biosynthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. En: P. Schreier (Ed). Bioflavour ;1988. pp 453–463.

Jawad R, Elleman C, Vermeer L, Drake FA, Woodhead B, Martín GP, Royall GP. The Measurement of the β/α Anomer Composition Within Amorphous Lactose Prepared by Spray and Freeze Drying Using a Simple $^1\text{H-NMR}$ Method. Pharm Res 2012; 29:511-524.

Kang JH, Lee MK, Kim KL, Hahm KS. Structure biological activity relationship of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. Int J Pept Protein Res 1996; 48:357-363.

Kosaric N & Asher YJ. The utilization of cheese whey and its components. Adv Biochem Eng 1985; 35:25-60.

Lambrechts A & Pretorius I. Yeast and its importance to wine aroma. South African J Agric Sci 2000; 21: 97-129.

Large PJ. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. Yeast 1986, 2: 1-34.

Lee H, Song M, Yu Y, Hwang S. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. Biochem Eng 2004; 15:93-99.

Lomascolo A, Lesage ML, Haon M, Navarro D, Antona C, Faulds C & Marcel A. Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of

L-phenylalanine into 2-phenylethanol. *World J Microbiol Biotechnol* 2001; 17: 99-102.

Madureira AR, Tavares T, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J Dairy Sci* 2010; 93: 437-455.

McMurry J. *Organic chemistry*. 6th ed. Belmont: Brooks/ Cole; 2004. pp 156-163.

McSweeney PHL, Fox PF. *Advanced dairy chemistry: volumen 3: lactose, water, salts and minor constituents*. New York: Springer Science; 2009. pp 132-145.

Nath A, Subhoshmita M, Tiyasha K, Sudip C, Stefano C, Chiranjib B. Synthesis and functionality of proteinacious nutraceuticals from casein whey-A clean and safe route of valorization of dairy waste. *Chemical Engineering Research and Design* 2015; 97:192-207.

Nitsche S, Abrahão J & Karoly G. Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie van Leeuwenhoek. J Microbiol* 2011. Springer Science+Business Media B.V. 10.1007/s10482-011-9617-7. Obtenido de: <http://www.springerlink.com/content/b102u31582w54921/fulltext.html>

Padín GC & Díaz FM. Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009, 29:110-116.

Páez G, Pérez A, Araujo A, Mármol Z & Rincón M. Effect of lactose concentration over β -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554 in fed batch cultures. *Rev Soc Ven Microbiol* 2012; 32:50-54.

Parra HRA. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 2009; 62(1): 4967-4982.

-
- Pisecký J. Spray drying in the cheese industry. *International Dairy Journal* 2005, 15:531-536.
- Platt A & Reece RJ. The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J.* 1998, 17:4086-91.
- Prazeres AR, Carvalho F & Rivas J. Cheese whey management: A review. *J Environ Manage* 2012; 110:48-68.
- Prazeres AR, Carvalho F & Rivas J. Fenton-like application to pretreated cheese whey wastewater. *J Environ Manage* 2013; 129: 199-205.
- Prudêncio S, Müller C, Fritzen-Freire B, Castanho R & Cunha C. Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. *Food Res Int* 2014; 56: 92–99.
- Rapp A & Mandery H. Wine aroma. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1986; 42: 873-884.
- Raymond Y, Morin A, Cormier F, Champagne C & Dubean H. Physical factors influencing the production on strawberry aroma by *Pseudomonas fragi* grown on skim milk. *Biotechnology Letters* 1990, 12: 931-936.
- Rektor A, Vatai G. Membrana filtration of Mozzarella whey. *Desalination* 2004; 162:279-286.
- Rouwenhorst RJ, Ritmeester WS, Scheffers WA & Van Dijken J P Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Applied Environmental Microbiology* 1990; 56: 3329-3336.
- Schindler J, Schmid R. Fragrance or aroma chemicals-microbial synthesis and enzymatic transformation. *Process Biochemistry* 1982; 17: 2-8.

-
- Schrader J, Etschmann MMW, Sell D, Hilmer JM, Rabenhorts J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds-current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters* 2004; 26:463-472.
- Serpe D, Von Stockar U & Marison I. Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 2003; 82: 103-110.
- Siso MIG. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technol* 1996; 57:1-11.
- Smithers, W G. Whey-ing up the options-Yesterday, today and tomorrow. *J Dairy Sci* 2015, doi: 10.1016/j.idairyj.2015.01.011.
- Souza RR, Bergamasco R, Costa SC, Feng X, Faria SHB, Gimenes ML. Recovery and purification of lactose from whey. *Chem Eng Process* 2010; 9:1137-1143.
- Spălățelu C. Biotechnological valorisation of whey. *Innovat Rom Food Biotechnol* 2012; 10:1-8.
- Stark D, Münch T, Sonnleitner B, Marison I W & Stockar von U. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog* 2002; 18:514-523.
- Stark D; Zala D; Münch T; Somnleitner B; Marison I & Von U. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32: 212-223.
- Teixeira JA, Mota M & Goma G. Continuous ethanol Production by a flocculating strain of *Kluyveromyces marxianus*: bioreactor performance. *Bioprocess Eng* 1990; 5:123-127.

-
- Valencia E & Ramírez M. La industria de la leche y la contaminación del agua. Rev Elements 2009; 73:27-31.
- Vasala A, Panula J, Neubauer P. Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms. J Biotechnol 2005; 117:421-431.
- Verdurmen REM, Van Houwelingen G, Gunsing M, Verschueren M & Straatsma J. Agglomeration in spray drying installations. Drying Technology 2006; 24: 721-726.
- Wittmann C, Hans M & Bluemke W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. Yeast 2002; 19: 1351-1363.
- Zhou XH, Xu LJ, Chi Z, Liu LG & Chi MZ. β -Galactosidase over-production by *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. Biochem Eng J 2013; 76: 17-24.
- Zopellari F & Bardi L. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. New Biotechnol 2013; 30: 607-613.