

---

## PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE SUERO DE LECHE EN CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO CON CICLOS REPETIDOS

---

Karelen Araujo, Alejandra Romero, Patricia Chirinos, Gisela Paéz, Zulay Mármol y Marisela Rincón

### RESUMEN

Se evaluó la producción de etanol a partir de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 usando lactosuero como sustrato previamente desproteinizado, mediante cultivos por lote alimentado con ciclos repetidos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se estudiaron a dos concentraciones de lactosa, 6,0 y 10% p/v a pH 5,0; temperatura 30°C y con una velocidad de agitación de 150rpm. Se empleó un biorreactor Bioflo 4000 con un volumen de trabajo de 4500 litros y controles automáticos de temperatura y velocidad de agitación. La alimentación se adicionó al reactor con un flujo de 0,375l·h<sup>-1</sup> y cada ciclo de lote alimentado tuvo una duración de 4h. El lactosuero ultrafiltrado y concentrado se caracterizó en

términos de pH, fósforo, cenizas, lactosa a través del método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico, contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl, y proteínas, multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6,38. La biomasa en el medio de cultivo se determinó con la técnica de peso seco. La producción de etanol se determinó utilizando cromatografía de gases con detector FID a 250°C y con una columna HP5. La mayor concentración de biomasa fue de 78,15 ± 0,1120kg·m<sup>-3</sup> y de etanol 31,392 ± 0,0053kg·m<sup>-3</sup> para el suero concentrado al 10%. Los resultados demostraron que la producción de etanol en el cultivo por lote alimentado con ciclos repetidos arroja mejores rendimientos en comparación con los obtenidos por carga.

---

### Introducción

La producción de CO<sub>2</sub> proveniente de la utilización de combustibles fósiles, aunado al resultante del cambio

climático, es uno de los principales problemas de contaminación ambiental a nivel mundial, por lo que hay necesidad de cambiar el empleo de combustibles fósiles por recursos

naturales renovables. El etanol puede ser utilizado como sustituto de este tipo de combustibles en los vehículos de combustión interna como carburante, aditivo, disolvente y

más recientemente en la elaboración de celdas de hidrógeno. Este producto puede obtenerse a partir de diferentes materias primas como caña de azúcar, maíz, trigo o

---

### PALABRAS CLAVE / Bioprocesos / Cultivo por Lote Alimentado / Etanol / Lactosuero /

---

Recibido: 28/03/2014. Modificado: 24/03/2015. Aceptado : 26/03/2015.

**Karelen Araujo.** Ingeniera Química, Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos y Doctora en Ingeniería, La Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Profesora, LUZ, Venezuela. Dirección: Laboratorios de Tecnología de Alimentos y Fermentaciones

Industriales. Facultad de Ingeniería, LUZ. Apartado 526. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. e-mail: karelena-raujo@gmail.com

**Alejandra Romero.** Ingeniera Química, LUZ, Venezuela.

**Patricia Chirinos.** Ingeniera Química, LUZ, Venezuela.

**Gisela Paéz.** Ingeniera Química y Magister en Ingeniería Química, LUZ, Venezuela. Profesora, LUZ, Venezuela.

**Zulay Mármol.** Mármol. Ingeniera Química y Magister en Ingeniería Química, LUZ, Venezuela. Profesora, LUZ, Venezuela.

**Marisela Rincón.** Marisela Rincón. Ingeniera Química y Magister en Ingeniería Química, LUZ, Venezuela. Profesora, LUZ, Venezuela.

## ETHANOL PRODUCTION FROM WHEY USING FED-BATCH CULTURE WITH REPEATED CYCLES

Karelen Araujo, Alejandra Romero, Patricia Chirinos, Gisela Paéz, Zulay Mármol and Marisela Rincón

### SUMMARY

Ethanol production from *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* 8554 was evaluated using previously de-proteinated whey as a substrate, by means of fed-batch culture with repeated cycles. All the experiments were made by triplicate using two lactose concentrations, 6.0 and 10.0% w/v, at pH 5.0 and 30°C, with agitation at 150rpm. A Bioflo 4000 bioreactor was used with working volume of 4500 liters and automatic temperature and agitation speed controls. The reactor was fed at 0,375l·h<sup>-1</sup> using 4h cycles. The fresh and concentrated whey was characterized in terms of pH, phosphorus,

ash, lactose through spectrophotometric phenol-sulfuric acid method, nitrogen content by the Kjeldahl method, and protein multiplying the percent nitrogen by 6.38. Biomass in the culture medium was determined by dry weight loss. Ethanol production was determined by gas chromatography. The highest concentration of biomass was 78,15 ±0,1120g·m<sup>-3</sup> and that of ethanol was 31,392 ±0,0053kg·m<sup>-3</sup> for 10% lactose whey. Results showed that ethanol production in the fed-batch culture with repeated cycles gave better results in comparison to those obtained with loading.

## PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SORO DE LEITE EM CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO COM CICLOS REPETIDOS

Karelen Araujo, Alejandra Romero, Patricia Chirinos, Gisela Paéz, Zulay Mármol e Marisela Rincón

### RESUMO

Avaliou-se a produção de etanol a partir de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554 usando lactosoro como substrato previamente desproteínizado, mediante cultivos por lote alimentado com ciclos repetidos. Os ensaios se realizaram por triplicado e foram estudados em duas concentrações de lactose, 6,0 e 10% (p/v) pH 5,0; temperatura 30°C e com uma velocidade de agitação de 150rpm. Empregou-se um biorreator Bioflo® 4000 com um volume de trabalho de 4500 litros e controles automáticos de temperatura e velocidade de agitação. A alimentação foi adicionada ao reator com um fluxo de 0,375l·h<sup>-1</sup> e cada ciclo de lote alimentado teve uma duração de 4h. O lactosoro ul-

trafiltrado e concentrado se caracterizou em função do pH, fósforo, cinzas, lactose através do método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico, conteúdo de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, e proteínas, multiplicando a porcentagem de nitrogênio em 6,38 vezes. A biomassa no meio de cultivo foi determinada com a técnica de peso seco. A produção de etanol se determinou utilizando cromatografia de gases com detector FID a 250°C e com uma coluna HP5. A maior concentração de biomassa foi de 78,15 ±0,1120kg·m<sup>-3</sup> e a de etanol foi de 31,392 ±0,0053kg·m<sup>-3</sup> para o soro concentrado em 10%. Os resultados demonstraram que a produção de etanol no cultivo por lote alimentado com

harina de yuca (Christensen *et al.*, 2011; Castaño *et al.*, 2012). Sin embargo, el empleo de estas materias primas es cuestionable debido a son fuentes de alimentos.

Es posible la obtención de etanol a partir de suero de leche, el cual es un subproducto de la industria láctea con un alto potencial contaminante por los altos contenidos de DBO y DQO, de 50g·l<sup>-1</sup> y 80g·l<sup>-1</sup> respectivamente (Ozmihci y Kargi, 2007; Hadiyanto *et al.*, 2014). Generalmente, las plantas procesadoras de queso no hacen un uso adecuado de este subproducto y la mayor parte es descargada a los cuerpos de agua (Parra, 2009). No obstante, también es empleado como suplemento en la alimentación animal.

El suero de leche ha sido empleado como sustrato para

la generación de combustibles limpios como el etanol (Ozmihci y Kargi, 2006; 2007; Padín y Días, 2006; Christensen *et al.*, 2011). Para la elaboración de este combustible se ha utilizado la levadura *Kluyveromyces marxianus*, la cual ha sido ampliamente utilizada en el bioprocesamiento del suero de leche y es capaz de fermentar la lactosa a etanol directamente (Christensen *et al.*, 2011). La producción de etanol usando el suero de leche como sustrato se ha llevado a cabo a través de diferentes métodos: fermentaciones por carga con microaeración (Ghaly y El-Tawel, 1995), fermentaciones continuas a diferentes tasas de dilución (Ghaly y El-Tawel, 1997) y métodos de inmovilización de levaduras

termotolerantes, (Kourkuotas *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2010; Gabardo *et al.*, 2014). Sin embargo, en la mayoría de esos estudios se obtienen bajos rendimientos de etanol debido al bajo contenido de lactosa del suero de leche. No está reportado en la literatura el empleo de suero de leche concentrado para la producción de etanol usando cultivo por lote alimentado con ciclos repetidos, proceso que ofrece ventajas sobre otros, ya que se evitan los fenómenos de inhibición por sustrato como resultado de una baja concentración de sustrato concentrado. Por tal motivo, el objetivo principal de este trabajo es evaluar la producción de etanol utilizando *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* en cultivo por lote alimentado con ciclos

repetidos, a partir de suero de leche como sustrato.

### Materiales y Métodos

#### Microorganismo

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554, obtenida de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EEUU), cultivado en medio agar YEPD.

#### Sustrato

Como sustrato se empleó suero de leche con 6,0 y 10,0% p/v de lactosa, proveniente de la producción de queso prensado, proporcionado por la empresa Lácteos Pacomela C.A, ubicada en La Concepción, estado Zulia, Venezuela.

## Procesamiento del suero de leche

Se aplicó un tratamiento termoácido. Para ello se ajustó el pH a 4,5 con HCL 6N y se calentó a 90°C por 10min. Se dejó enfriar hasta una temperatura por debajo de 35°C para someterlo al proceso de ultrafiltración y así garantizar una eficiente desproteinización (Quintero *et al.*, 2001). Del suero sometido a ultrafiltración se obtuvieron dos corrientes de salida: un concentrado proteico que se hizo recircular para retirar la mayor cantidad de proteína posible y otra corriente rica en lactosa, la cual fue utilizada para los procesos de fermentación. Una vez desproteinizado el suero, se pasó por la membrana de nanofiltración, se separaron las sales y se obtuvo un recirculado concentrado de lactosa (Muñi *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2007). Se requirió un volumen de 90 litros para alcanzar la concentración de 10% p/v de lactosa. La temperatura de operación fue de 30°C y la presión de 150psi. El suero se suplementó con extracto de levadura 0,75% (Merck), sulfato de amonio 0,84% (Merck) y sulfato de magnesio 0,05% (Merck). El pH se ajustó a 5 y se esterilizó en un autoclave (Felisa) a 115°C y 24,52psi durante 15min (Cardona y Sánchez, 2007). Luego fue almacenado a 10°C hasta su posterior utilización.

## Caracterización del suero de leche

Se determinaron: nitrógeno por el método de Kjeldahl (Quintero *et al.*, 2001); proteínas, multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6,38 (AOAC, 1990); pH con un pHmetro marca Metrohm modelo Fwizland, según la Norma 1315-79 (COVENIN, 1979); lactosa por el método de Dubois *et al.* (1957); fósforo siguiendo el método de la AOAC (1995) y cenizas según la Norma 368-82 COVENIN (1994).

## Proceso de fermentación

El inóculo se preparó añadiendo a cada 200ml de medio

el contenido de dos cuñas de microorganismo activado (20ml) con un volumen total de 1 litro. Se incubó a 30°C y 150rpm durante 5h en una incubadora INNOVA 4300 New Brunswick Scientific (New Jersey, EEUU). Los cultivos por lote alimentado con ciclos repetidos se desarrollaron utilizando un fermentador Bioflo 4000 de 5 litros (New Brunswick Scientific). Se comenzó con una operación por carga con 3000ml del medio de cultivo (2000ml de lactosuero tratado y suplementado y 1000 ml del inóculo) con agitación a 150rpm y aireación de 1 vvm; el pH del lactosuero se ajustó a 5. Este proceso por carga duró hasta garantizar la fase de crecimiento exponencial, para luego iniciar el proceso por lote alimentado, agregando medio de cultivo fresco hasta que se alcanzó condiciones cuasi estacionarias. La alimentación se adicionó al reactor bajo condiciones asépticas con un flujo de 0,375l·h<sup>-1</sup> utilizando una bomba peristáltica (Watson-Marlow, Modelo 323) hasta alcanzar un volumen total de 4500ml. Cada ciclo de lote alimentado continuó por 4h con agitación de 150rpm, sin control de pH y aireación de 1 vvm, seguido de 4h de operación por lote sin agitación y sin aireación. Se removieron 1500ml del caldo fermentado al finalizar cada operación de lote alimentado, las que se desarrollaron bajo las mismas condiciones, a un caudal constante 0,375l·h<sup>-1</sup> y sin control de pH.

Se determinó la absorbancia del inóculo a 580nm con un espectrofotómetro Varian UV-50-10 (Victoria, Australia) y se realizó un conteo directo de células para estandarizar la concentración de biomasa inicial. Para ello se empleó un microscopio Will-Wetzlar GMBH d 6330 Wetzlar 21 (Netzstecker, Alemania) y una cámara de Neubauer Propper (Long Island City, NY, EEUU).

## Análisis efectuados durante la fermentación

Se tomaron muestras cada hora y le fueron realizados los siguientes análisis:

**Biomasa.** La concentración de biomasa se determinó turbidométricamente midiendo la absorbancia de la muestra a 580nm en un espectrofotómetro modelo Cary UV- 50 Varian (Mulgrave, Victoria, Australia). La densidad óptica fue relacionada con el peso seco de biomasa por unidad de volumen a través de la construcción previa de una curva de calibración.

**Lactosa.** El contenido de lactosa se determinó utilizando el método espectrocolorimétrico (método fenol - ácido sulfúrico) de Dubois *et al.* (1957) empleando un espectrofotómetro modelo Cary UV-50 Varian (Mulgrave, Victoria, Australia) a intervalos constantes de 1h desde el inicio de la fermentación, a una longitud de onda de 490nm.

**Etanol.** La concentración de etanol se determinó utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890L, con una columna HP5 y provisto de detector FDI y se utilizó un método estándar externo desarrollado para éste análisis. Las condiciones de operación fueron: temperatura del FDI 230°C, Split 100:1, gas de arrastre helio, horno a 40°C, temperatura del detector 250°C, velocidad de flujo de calor 10°C/ min -100°C.

**pH.** Se determinó el pH a través del pHmetro marca Metrohm modelo Fwizland.

## Análisis estadístico

Se llevaron a cabo tres réplicas de los cultivos por lote alimentado con ciclos repetidos a

30°C y concentraciones de lactosa de 6,0 y 10,0% p/v. Se realizó un test de significación t-student ( $\alpha= 0,05$ ), para establecer el efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 8554, el consumo de la lactosa y la producción de etanol a las distintas concentraciones de lactosa.

## Resultados y Discusión

### Composición del suero de leche

La caracterización del lactosuero empleado en este estudio se muestra en la Tabla I. El suero crudo es un suero de leche dulce debido a que presenta un pH de 6,431 ±0,458 y coincide con los valores reportados por Badui (2006). El pH para el suero ultrafiltrado y concentrado disminuyó con respecto al suero crudo debido a los procesos de acidificación y calentamiento realizados durante el tratamiento termoácido. El alto contenido de proteína en el suero crudo se debe a que es obtenido de la primera etapa o corte de producción del queso; el valor coincide con el reportado por Quintero *et al.* (2001). El suero ultrafiltrado presentó una concentración menor de lactosa inicial que el suero crudo, mientras que el contenido de nitrógeno y proteína se redujo notoriamente, demostrando la eficiencia de los procesos de desproteinización aplicados.

Para el suero concentrado se obtuvo una concentración de lactosa de 101,251kg·m<sup>-3</sup> utilizando una membrana de nanofiltración. El porcentaje

TABLA I  
CARACTERIZACIÓN DEL SUERO DE LECHE\*

Composición	Suero crudo	Suero ultrafiltrado	Suero concentrado
pH	6,431 ±0,458	4,532 ±0,234	4,723 ±0,113
Lactosa (kg·m <sup>-3</sup> )	71,882 ±0,458	60,947 ±0,563	101,251 ±0,371
Nitrógeno (% p/v)	0,187 ±0,056	0,050 ±0,027	0,045 ±0,019
Proteína (% p/v)	1,193 ±0,058	0,319 ±0,017	0,285 ±0,034
Fósforo (% p/v)	0,295 ±0,025	0,112 ±0,050	0,028 ±0,024
Cenizas (% p/v)	0,568 ±0,143	0,392 ±0,138	0,581 ±0,025

\* Valores promedio de triplicados.

de proteína no varió considerablemente debido a que el proceso de nanofiltración se utilizó para obtener una mayor concentración de lactosa. De acuerdo a los resultados obtenidos por Muñi *et al.* (2005) se observa en la Tabla I que la desproteínización es más efectiva utilizando el proceso de tratamiento térmico junto al proceso de ultrafiltración tangencial, que solo el procedimiento termoácido reportado por Quintero *et al.* (2001).

En la Figura 1 se ilustra la producción de biomasa a diferentes concentraciones de lactosa inicial obtenida en un proceso por lote alimentado con tres ciclos repetidos (I, II y III). Se aprecia que al inicio del proceso del cultivo por carga cuando se utiliza suero ultrafiltrado, la fase de adaptación es corta con un crecimiento exponencial que tuvo una duración de ~6h, mientras que para el suero concentrado no se observa dicha fase, lo que puede señalar que para altas concentraciones no hubo una limitación en el transporte de lactosa y nutrientes hacia el interior de la célula, ya que se partió de células inducidas con

lactosa al utilizarse para la propagación del inóculo en el medio de trabajo; es decir, el inóculo estaba ya adaptado al crecimiento en las condiciones presentes en el medio fresco (Montiel *et al.*, 2000). La velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) a lo largo de la fase exponencial durante el proceso por carga fue ligeramente mayor cuando se utilizó suero concentrado ( $\mu_{\text{máx}} = 0,472 \pm 0,0166$ ) en comparación con el valor obtenido para el suero fresco ( $\mu_{\text{máx}} = 0,407 \pm 0,0151$ ), superando los valores reportados por Araujo *et al.* (2007) para suero concentrado ( $\mu_{\text{máx}} = 0,224 \pm 0,017$ ) y suero ultrafiltrado ( $\mu_{\text{máx}} = 0,290 \pm 0,006$ ). Se realizó un test de significación t-student ( $\alpha = 0,05$ ) y se obtuvo que las velocidades específicas del suero ultrafiltrado y concentrado no varían significativamente. Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial en el proceso de fermentación por carga, se da inicio a la alimentación del nuevo sustrato con las características iniciales del medio de cultivo, y así comenzar el lote alimentado con tres ciclos repetidos para cada bioproceso.

En la Figura 1 se puede apreciar que para ambos bioprocesos hay un aumento progresivo de la concentración de biomasa con respecto al tiempo para los ciclos I y II, donde se alcanzó condiciones cuasi estacionarias al final del ciclo II; obteniéndose mayor concentración de biomasa en el medio de fermentación para el suero concentrado. En el ciclo I de ambos bioprocesos, el microorganismo empieza a consumir gradualmente el nuevo sustrato alimentado.

En el ciclo II se aprecia un aumento del cultivo de célula donde se obtienen las máximas concentraciones de biomasa con respecto a los demás ciclos, en el suero ultrafiltrado fue de  $26,78 \pm 0,0856 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  y con el suero concentrado fue de  $78,15 \pm 0,1120 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ , siendo superior al encontrado por Araujo *et al.* (2007) de  $19,68 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  y por Ozmihi y Kargi (2007) de  $9,0 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ . Mediante el test de significación t-student se encontró que hay diferencia significativa entre los máximos valores de biomasa reportados en este

estudio con respecto a los trabajos anteriormente citados.

El ciclo III se llevó a cabo para demostrar que el microorganismo no fue capaz de metabolizar el sustrato alimentado, dando lugar a la fase de muerte. Por lo tanto, existe un decrecimiento en ambos comportamientos produciendo bajas concentraciones de biomasa.

La Figura 2 muestra el consumo de lactosa para las fermentaciones control y experimental en suero ultrafiltrado y concentrado. Puede observarse que en la fermentación control para ambos bioprocesos; la concentración de lactosa se incrementa con el tiempo, debido a la ausencia de células de levadura, para así determinar la cantidad de sustrato a consumir por parte del microorganismo. En la fermentación experimental, las concentraciones de lactosa fueron siempre inferiores que las de la fermentación control, debido a que hubo una efectiva utilización de lactosa por el microorganismo utilizado.

De lo anteriormente mencionado cabe destacar que el

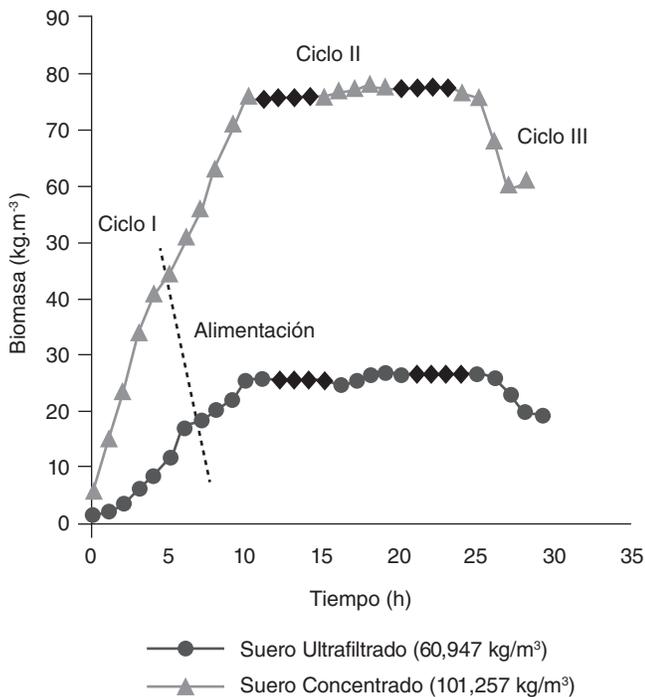


Figura 1. Producción de biomasa.

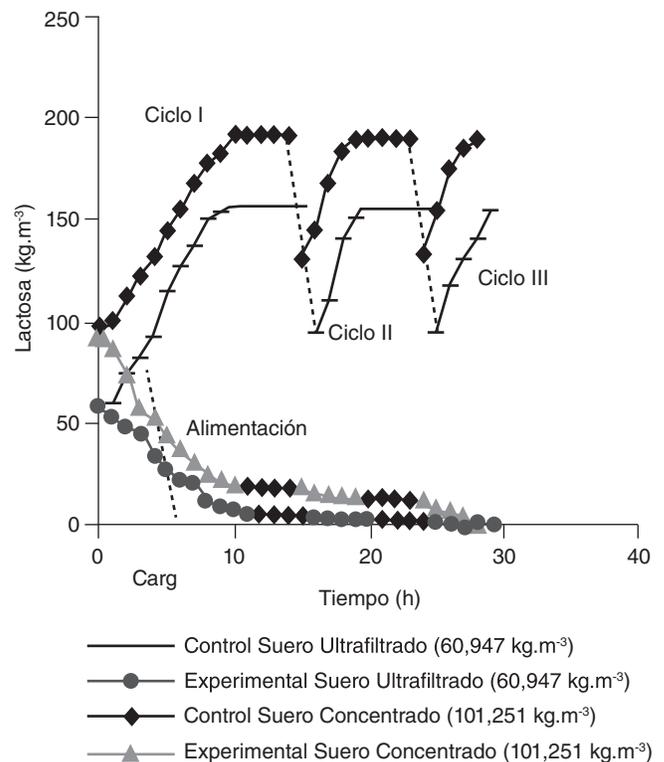


Figura 2. Consumo de lactosa.

comportamiento del microorganismo fue el esperado en cuanto a la utilización del sustrato debido a la velocidad de consumo, lo cual difiere a los resultados presentados por Ozmihci y Kargi (2007). Se observa también que en las fermentaciones experimentales para ambas concentraciones el consumo de lactosa es más rápido en la fase de adaptación durante el proceso por carga y disminuye gradualmente a medida que transcurren los tres ciclos. También muestra que al aumentar la concentración inicial del sustrato disminuye la velocidad de consumo.

En el suero ultrafiltrado, el sustrato ha sido consumido a las 20h, quedando un excedente de lactosa de  $2,66\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  que corresponde al 96,46% del lactosuero consumido durante el ciclo II, a diferencia del suero concentrado, donde el sustrato se consumió lentamente quedando una lactosa residual de  $13,73\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  que corresponde al 85,61% en el ciclo II y así dar inicio al ciclo III, en el cual se consume la lactosa en su totalidad a las 28h con  $1,08\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , que corresponde al 98,86%.

La Figura 3 muestra el comportamiento del pH para suero ultrafiltrado y concentrado en el proceso por lote alimentado con tres ciclos repetidos, lo cual se llevó a cabo con un pH inicial de  $5,0 \pm 0,254$  y luego transcurrió sin control durante todo el proceso de fermentación. El pH del medio disminuyó con el tiempo en las primeras 10h, hasta alcanzar niveles de  $4,28 \pm 0,106$ . Este comportamiento coincide lo observado por con Ozmihci y Kargi (2007). La disminución de pH puede deberse a la formación de otros productos tales como glicerol, enzimas, proteína unicelular y trazas de ácidos acético o láctico (Christensen, 2011). No obstante, la fermentación mostró altos rendimientos de etanol a  $30^\circ\text{C}$ ,  $150\text{vvm}$  y sin control de pH.

En la Figura 4 se muestra el efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la producción de etanol en una

operación de lote alimentado con tres ciclos repetidos. Se observa que durante las primeras horas de fermentación por carga para ambos bioprocesos la producción de etanol se incrementó gradualmente en función del tiempo alcanzado, mostrando que a medida que aumenta la concentración de lactosa inicial, aumenta la cantidad de alcohol producido. Como puede notarse, la mayor producción de etanol se produjo para suero concentrado, obteniéndose  $31,392\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  de alcohol en la hora 18 durante el ciclo II, mientras que para suero ultrafiltrado la producción de etanol fue de  $21,568\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  en la hora 19 del ciclo II. Estos valores superan los obtenidos por Padín y Díaz (2006). Inmediatamente luego de alcanzar el punto máximo se aprecia una disminución de la producción del alcohol.

En el ciclo III, para ambos bioprocesos se evidencia que para concentraciones de etanol por encima de  $31,392\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  y  $21,568\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$  se reduce la actividad de la levadura *K. marxianus*, probablemente debido a la tolerancia limitada de la misma (inhibición celular) a esas concentraciones de etanol alcanzadas en el medio de fermentación.

En la Tabla II se reportan los valores de rendimiento de etanol para cada concentración de lactosa estudiada. El coeficiente de rendimiento y la productividad aumenta ligeramente cuando aumenta la concentración de lactosa en el medio de fermentación.

El mayor rendimiento del proceso se obtuvo en la fermentación con suero concentrado, siendo de  $0,383 \pm 0,0086\text{kg etanol/kg lactosa}$ . A través de un test de significación t-student ( $\alpha = 0,05$ ) se determinó que los rendimientos de suero fresco y concentrado no varían significativamente. En la Tabla II también se puede observar que un aumento en la concentración inicial del sustrato muestra una alta productividad de etanol en el proceso de fermentación, la cual fue de  $1,774\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . El comportamiento del rendimiento y productividad

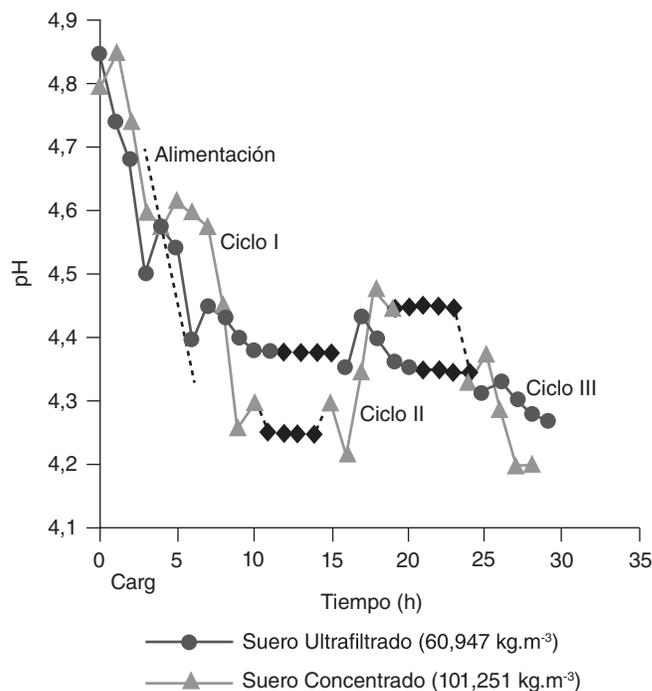


Figura 3. Comportamiento del pH.

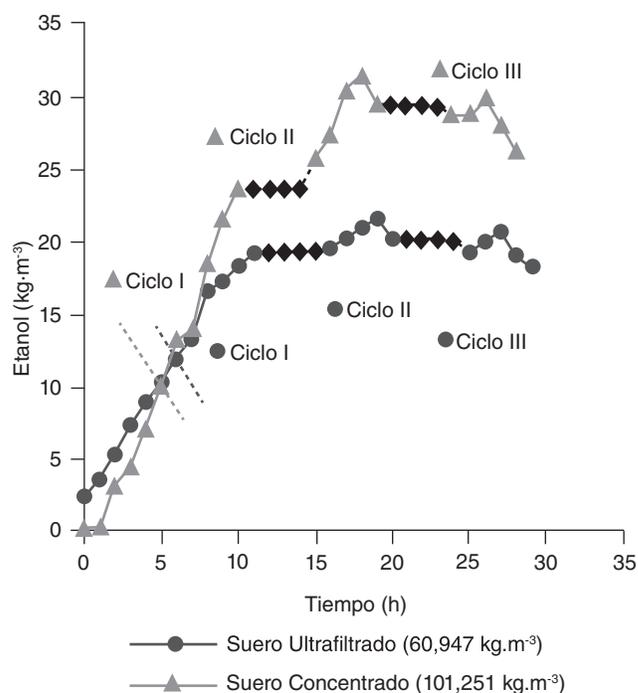


Figura 4. Producción de etanol.

TABLA II  
RENDIMIENTO DE PRODUCTO ( $Y_p$ ) Y  
PRODUCTIVIDAD (P) DEL ETANOL

Lactosa ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )	$Y_p$ (kg etanol/ kg lactosa)	P ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
60,947	$0,353 \pm 0,0095$ a	$1,135 \pm 0,019$ a
101,251	$0,383 \pm 0,0086$ a	$1,774 \pm 0,030$ b

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ).

obtenido es similar al reportado por Padín y Díaz (2006), Ozmihci y Kargi (2007) y Gabardo *et al.* (2014).

## Conclusiones

Los valores máximos de concentración de etanol obtenidos con el suero ultrafiltrado y concentrado fueron significativamente diferentes. La mayor concentración de biomasa, de  $78,15 \pm 0,112 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ , y la máxima concentración de etanol, de  $31,392 \pm 0,104 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ , se obtuvieron cuando se utilizó suero concentrado durante el ciclo II de la fermentación. El bioproceso con suero concentrado utilizando cultivo por lote alimentado con ciclos repetidos arroja valores de rendimiento y productividad de etanol superior a los reportados en procesos por carga y continuo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento que permitió el desarrollo de esta investigación.

## REFERENCIAS

- AOAC (1990) Official Methods of Analysis of Official 15<sup>th</sup> Edition. Arlington.
- Araujo K, Páez G, Mármol Z, Ferrer J, Ramones E, Aiello C, Rincón M (2007) Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de  $\beta$ -D-galactosidasa. *Rev. Téc. Fac. Ing. LUZ* 30: 64-73.
- Badui S (2006) *Química de los Alimentos*. 4<sup>a</sup> ed. Pearson. México. 604 pp.
- Cardona C, Sánchez O (2007) Producción de etanol: Avances en el diseño del proceso y oportunidades de integración. *Bioresource Technol.* 98: 2415-2457.
- Castaño Peláez H, Mejía Gómez C, Ríos Márquez Ó (2012) Producción de etanol a partir de harina de yuca utilizando diferentes estrategias en modo continuo. *Prod.+Limpia* 7: 88-100.
- Christensen AD, Kádár Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH (2011) Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 151-177.
- COVENIN (1979) Norma N° 1315-79. Norma Venezolana. Alimentos. Determinación del pH (Acidez Iónica). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Caracas, Venezuela.
- COVENIN (1995) Norma N° 368-82. Norma Venezolana. Leche Fluida. Determinación de cenizas. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Caracas, Venezuela. 7 pp.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1957) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Gabardo S, Rech R, Rosa C, Záchia M (2014) Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew. Energy* 69: 89-96.
- Ghaly AE, El-Tawel AA (1995) Effect of micro-aeration on the growth of *Candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. *Bioresource Technol.* 52: 203-217.
- Ghaly AE, El-Tawel AA (1997) Kinetics modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. *Biomass Bioenergy* 12: 461-472.
- Guo X., Zhou J., Xiao D. (2010) Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 160: 532-538.
- Hadiyanto AD, Puspita A, Pinundia D (2014) Optimization of ethanol production from whey through fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Proc.* 47: 108-112.
- Kourkouotas Y, Dimitropoulou S, Kanellaki M, Marchant R, Nigam P, Banat IM, Koutinas AA (2002) High temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresource Technol.* 82: 177-181.
- Montiel X, Carruyo I, Ferrer J, Marcano L, Mármol Z, Páez G (2000) Producción de  $\beta$ -galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga, con lactosuero como sustrato. *Rev. Téc. Fac. Ing. LUZ* 23: 134-140.
- Muñi A, Páez G, Faria J, Ramones E, Ferrer J (2005) Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Rev. Cient. Fac. Cs. Vet. LUZ* 15: 361-367.
- Ozmihci S, Kargi F (2006) Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enz. Microb. Technol.* 38: 711-718.
- Ozmihci S, Kargi F (2006) Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentration. *Bioresource Technol.* 98: 2978-2984.
- Ozmihci S, Kargi F (2007) Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enz. Microb. Technol.* 41: 876-880.
- Ozmihci S, Kargi F (2007) Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enz. Microb. Technol.* 41: 169-174.
- Padín GC, Díaz FM (2006) Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* 26: 35-41.
- Parra HR (2009) Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev. Fac. Nal. Agric.* 62: 4967-4982.
- Quintero H, Rodríguez Marval M, Páez G, Ferrer J, Mármol Z, Rincón M (2001) Producción de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir del suero de leche. *Rev. Cient. Fac. Cs. Vet. LUZ* 9: 87-94.