



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO DE LEVADURAS DE
Kluyveromyces marxianus EN SOPORTES SINTÉTICOS Y
NATURALES USANDO LACTOSA COMO FUENTE DE
CARBONO Y ENERGÍA**

Tesis que para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
LUZ MARÍA ZENIT TOVAR CASTRO

DIRECTOR: DR. J. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Agosto de 2009

México D.F. a 7 de Agosto del 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO DE LEVADURAS DE
Kluyveromyces marxianus EN SOPORTES SINTÉTICOS Y
NATURALES USANDO LACTOSA COMO FUENTE DE
CARBONO Y ENERGÍA**

que presentó

LUZ MARÍA ZENIT TOVAR CASTRO

COMITÉ TUTORAL:

Director: DR. J. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: DR. MARIANO GARCÍA GARIBAY

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

JURADO:

Presidente: DR. ERNESTO FAVELA TORRES
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario: DR. MARIANO GARCÍA GARIBAY
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ SERRANO
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Se agradece el trabajo de revisión de tesis del Dr. Marcos Meneses Mayo

"El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y además cuenta con el apoyo del mismo con el número de registro 175043".

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4) perteneciente al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa en México D.F., bajo la dirección del Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda. Se agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado.

México D.F. a 7 de Agosto del 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO DE LEVADURAS DE
Kluyveromyces marxianus EN SOPORTES SINTÉTICOS Y
NATURALES USANDO LACTOSA COMO FUENTE DE
CARBONO Y ENERGÍA**

que presentó

LUZ MARÍA ZENIT TOVAR CASTRO

COMITÉ TUTORAL:

Director: DR. J. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: DR. MARIANO GARCÍA GARIBAY

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

JURADO:

Presidente: DR. ERNESTO FAVELA TORRES

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario: DR. MARIANO GARCÍA GARIBAY

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ SERRANO

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Se agradece el trabajo de revisión de tesis del Dr. Marcos Meneses Mayo

Agradezco a Dios por permitirme seguir aquí, a mis hermanos, amigos, a todas las personas involucradas en mi vida, muchas gracias.

A Ernesto y Gerardo, por todo el apoyo y la enseñanza pero sobre todo por su amistad.

A Toño, por seguir caminando juntos en todo momento, por ser mi motor y por despertar a mi lado todos los días, te amo corazón.

Dedico este trabajo a mis padres, porque no hay palabras suficientes para agradecerles el amor, el esfuerzo y sacrificio, porque sé que siguen iluminando mi camino. Los amo.

RESUMEN

El suero de leche es el principal coproducto de la industria quesera, puede causar problemas ambientales si no es tratado adecuadamente. Entre varias alternativas biotecnológicas, las levaduras del género *Kluyveromyces* pueden utilizar la lactosa como fuente de carbono y energía para la producción de biomasa y enzimas de interés industrial. Por otra parte, debido a las características del cultivo en medio sólido (CMS) resulta interesante desarrollar un estudio fundamental sobre el crecimiento y fisiología de *Kluyveromyces* en este sistema de cultivo.

En este sentido, usando un sistema modelo con espuma de poliuretano como soporte, se determinó el efecto del nivel de inóculo, el uso de amortiguadores de pH, el origen de la fuente de nitrógeno y la concentración de lactosa y nutrientes sobre las variables principales del CMS de *Kluyveromyces marxianus* (fases de retardo, tasas de actividad respiratoria, CO₂ total formado, biomasa, consumo de lactosa, rendimientos de biomasa y de actividades enzimáticas). Se estudiaron las cepas UCDCC 351, NCYC 587, 1109, 1429, CDBBL 278 y Agua Miel A1. Asimismo, se llevaron a cabo estudios preliminares del cultivo de *K. marxianus* sobre bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo impregnados con suero de leche industrial en un reactor de charolas y en reactor agitado por listones helicoidales.

Se llevaron a cabo estudios para determinar las condiciones de cultivo de *K. marxianus* CDBBL 278 en medio sólido empleando espuma de poliuretano como soporte inerte, el cual fue impregnado con medio de cultivo conteniendo lactosa. El seguimiento de las diferentes fases de crecimiento de esta levadura se llevó a cabo por respirometría, seleccionando el nivel de inoculación de 2.5×10^6 células por gramo de materia seca (gms) para estudios posteriores.

Al llevar a cabo CMS con esta levadura empleando dos amortiguadores de pH: amortiguador de acetatos de sodio y amortiguador de fosfatos de potasio, no hubo diferencia significativa en el pH final del cultivo. Se observó una diferencia significativa ($\alpha < 0.5$) en la producción de biomasa (53 ± 0.1 mg/gms), rendimiento celular (0.36 ± 0.01) y consumo de lactosa (90 %) cuando se empleó el amortiguador de fosfatos en el medio de cultivo y por esto fue seleccionado para estudios posteriores.

Al estudiar la adición de mezclas de sulfato de amonio y urea no se logró regular el pH en los cultivos, sin embargo, bajas concentraciones de urea (20 % del N_T) favorecieron la actividad enzimática tanto de lactasa como de inulinasa para todas las cepas estudiadas (UCDCC 351, NCYC 587, NCYC 1109, NCYC 1149, CDBBL 278 y Agua Miel A1). Las cepas NCYC 587 y CDBBL 278 presentaron los mayores títulos de actividad lactasa e inulinasa, respectivamente, cuando 20 % de la fuente de nitrógeno provino de urea (2038.3 y 241.6 UI/gX, respectivamente) y por ello fueron seleccionadas para estudiar el efecto del aumento en la concentración de lactosa así como de todos los nutrientes del medio en el CMS de *K. marxianus*. La máxima producción de biomasa para las cepas NCYC 587 y CDBBL 278 (71.7 ± 5.1 y 95.8 ± 5.1 mg/gms, respectivamente) se obtuvo con la mayor concentración de lactosa presente en el medio de 150 g/L. La mayor tasa de actividad respiratoria (0.3 ± 0.003 y 0.4 ± 0.001 h⁻¹, respectivamente), así como el mayor consumo de lactosa y rendimiento de biomasa (91.4 ± 0.3 % y 0.36 ± 0.01 mg/gms, respectivamente) se obtuvo con una concentración de lactosa de 50 g/L, para ambas cepas.

Al emplear el suero de leche fresco como sustrato, éste amortiguó el pH en el cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278, con un consumo casi total de lactosa (99 ± 1.2 y 98 ± 1.1 %, respectivamente) y rendimientos similares a los reportados en la literatura para estas levaduras (0.32 ± 0.06 y 0.33 ± 0.03 , respectivamente) en CML.

Las cepas de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 fueron capaces de crecer sobre bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo como soportes naturales empleando suero de leche industrial. Con la cepa CDBBL 278 se llevaron a cabo CMS empleando rastrojo de sorgo como soporte usando columnas de fermentación, un reactor de charolas y un reactor agitado por listones helicoidales. Los mejores valores de las variables principales del cultivo: fase de retardo, μ_{CO_2} , X, $Y_{X/S}$ y rendimientos de actividades enzimáticas de lactasa e inulinasa, se obtuvieron cuando el cultivo se llevó a cabo en reactor de charolas (7.5 h, 0.35 h⁻¹, 54 ± 3.8 mg X/gms, 0.36 ± 0.02 , 1755 ± 80 UI/gX y 166 ± 25.2 UI/gX, respectivamente). Los rendimientos de actividad lactasa en cultivo en columnas y en reactor de charolas (1433 ± 15 y 1754.7 ± 80 UI/gX, respectivamente), aumentaron en un 25 y 53 %, respectivamente, en comparación con los obtenidos en trabajos anteriores (1148 UI/gX).

Por último, con el rastrojo de sorgo fermentado se llevaron a cabo pruebas bromatológicas y de digestibilidad ruminal, encontrando que este residuo fermentado con la levadura aporta un mayor contenido proteínico (6.7 ± 0.2 %) que puede ser un factor determinante en la propagación de bacterias ruminales y promover una mayor digestibilidad de los compuestos fibrosos, por lo que se puede emplear en mezcla con otros ingredientes de la dieta de animales rumiantes.

En este trabajo se presenta evidencia experimental indicando que es posible establecer las condiciones nutricionales de cultivo para la levadura *Kluyveromyces marxianus* en un sistema modelo, lo cual permitió extrapolar los resultados a un sistema más cercano a la realidad. Los resultados indican el potencial que presenta el CMS en resolver problemas ambientales y contribuir parcialmente a la producción de alimentos para rumiantes.

ABSTRACT

The whey is the main byproduct in the dairy industry and it can cause environmental problems if it is not treated suitable. Between several biotechnological alternatives, the yeasts belonging to the genus *Kluyveromyces* can metabolize lactose as carbon source and energy for the production of biomass and enzymes of industrial interest. On the other hand, due to the characteristics of the solid state culture (SSC), it is interesting to develop a fundamental study on the growth and physiology of *Kluyveromyces* in this culture system.

In this sense, using a SSC with polyurethane foam like support, the effect of inoculum level, the use of pH buffers, the nitrogen source and the lactose concentration and nutrients on the main variables of the SSC (lag phase, respiratory activity rate, total CO₂ formed, biomass, lactose consumption, yields and enzymatic activities) using *Kluyveromyces marxianus* was determined.. UCDCC 351, NCYC 587, 1109, 1429, 278 CDBBL and AGUA MIEL A1 strains were studied. Preliminary studies of the SSC of *K. marxianus* were also carried out on sugar cane bagasse and sorghum strubble impregnated with industrial whey in a tray reactor and in a helical ribbons rotating reactor.

Studies were carried out to determine the conditions of SSC of *K. marxianus* CDBBL 278 using polyurethane foam impregnated with culture medium containing lactose. The monitoring of different growth phases was carried out by respirometry. An inoculation level of 2.5×10^6 cells per gram of dry matter (gdm) was selected for further studies.

SSC cultures using two buffers: sodium acetate and potassium phosphate showed no significant difference in the final pH of the culture. Nevertheless, a significant difference ($\alpha < 0.5$) in the biomass production (53 ± 0.1 mg/gdm), cellular yield (0.36 ± 0.01) and lactose consumption (90%) was observed when a phosphate buffer was used and for this reason phosphate buffer was selected for further studies.

The addition of ammonium sulfate and urea mixtures didn't avoid changes in the pH of the cultures; nevertheless, low urea concentrations (20% of the N_T) favored the enzymatic activity of lactase as well as inulinase for all the studied strains (UCDCC 351, NCYC 587, NCYC

1109, NCYC 1149, 278 CDBBL and Agua Miel A1). NCYC 587 and CDBBL 278 strains presented the higher titles of lactase and inulinase activity, respectively, when 20 % of the nitrogen source was provided by urea (2038.3 and 241.6 IU/gX, respectively). This condition was selected to study the effect of the increase in the lactose concentration as well as of all the nutrients in SSC of *K. marxianus*. The maximum production of biomass for NCYC 587 and CDBBL 278 strains (71.7 ± 5.1 and 95.8 ± 5.1 mg/gdm, respectively) was obtained at a lactose concentration of 150 g/L. The greater rate of respiratory activity (0.3 ± 0.003 and 0.4 ± 0.001 h⁻¹, respectively), as well as the higher lactose consumption and biomass production ($91.4 \pm 0.3\%$ and 0.36 ± 0.01 mg/gdm, respectively) were obtained with 50 g/L lactose.

Fresh whey was used as substrate in SSC of *K. marxianus* NCYC 587 and CDBBL 278, with an almost total lactose consumption (99 ± 1.2 and $98 \pm 1.1\%$, respectively) and similar yields to those reported in the literature for these strains (0.32 ± 0.06 and 0.33 ± 0.03 , respectively) in submerged cultures.

Kluyveromyces marxianus NCYC 587 and CDBBL 278 strains were able to grow on sugar cane bagasse and sorghum strubble as natural supports using industrial whey. In the case of CDBBL 278 SSC were carried using sorghum strubble like support using 3 fermentations systems: a small columns reactor, a tray reactor and a helical ribbons rotating reactor. The best values of the main variables of the culture: lag phase, μ_{CO_2} , X, $Y_{X/S}$ and lactase and inulinase activities, were obtained when the culture was carried out in the tray reactor (7.5 h, 0.35 h⁻¹, 54 ± 3.8 mgX/gdm, 0.36 ± 0.02 , 1755 ± 80 IU/gX and 166 ± 25.2 IU/gX, respectively). The lactase activity yields in columns and tray reactor (1433 ± 15 and 1754.7 ± 80 IU/gX, respectively), increased in 25 and 53%, respectively, in comparison with the obtained in previous work (1148 IU/gX).

In the case of the sorghum strubble fermented material, bromatologicals and ruminal digestibility assays were carried out, finding that the protein content was increased to $6.7 \pm 0.2\%$, this fact can be an important factor in the growth of ruminal bacteria and for promoting a greater digestibility of fiber compounds for that reason it can be used in mixture with other ingredients of the ruminant feed.

In this work experimental evidence appears indicating that is possible to set the nutritional conditions of culture for the *Kluyveromyces marxianus* yeast in a SSC system model, it allowed extrapolation of the results to a real system. The results indicate the potential that represents the SSC in solving environmental problems and contributing partially to the feed production for ruminants.

CONTENIDO

CONTENIDO	i
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
GLOSARIO Y ABREVIATURAS	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 LEVADURAS Y SU IMPORTANCIA	3
2.2 BIOQUÍMICA, METABOLISMO Y FISIOLOGÍA DE <i>Kluyveromyces marxianus</i>	4
2.3 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE <i>Kluyveromyces marxianus</i>	7
2.4 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO (CML) Y EN MEDIO SÓLIDO (CMS)	11
2.5 CULTIVO DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> EN CML Y EN CMS	14
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	17
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVO GENERAL	18
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	18
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO	19
5.1.1 MICROORGANISMOS	19
5.1.2 MEDIOS DE CULTIVO	19
5.2 CONDICIONES DE CULTIVO	20
5.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	20
5.2.2 TRATAMIENTO DEL SOPORTE	20
5.2.3 CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO (CMS)	20
5.2.3.1 CMS EN COLUMNAS DE VIDRIO	20
5.2.3.2 CMS EN REACTOR DE CHAROLAS Y REACTOR DE LISTONES	21

5.3 CULTIVO DE <i>K. marxianus</i> EN MEDIO SÓLIDO EMPLEANDO 4 NIVELES DE INOCULACIÓN Y USO DE AMORTIGUADORES.	24
5.4 CULTIVO DE <i>K. marxianus</i> EN SÓLIDO VARIANDO LA FUENTE DE NITRÓGENO	24
5.5 CULTIVO DE <i>K. marxianus</i> EN MEDIO SÓLIDO AUMENTANDO LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO.	24
5.6 CMS DE <i>K. marxianus</i> EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO, PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTES SINTÉTICOS	25
5.7 TRATAMIENTO DE MUESTRAS	25
5.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS	26
5.8.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA	26
5.8.2 DETERMINACIÓN DE LACTOSA	27
5.8.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD, pH, Aw Y CONCENTRACIÓN CELULAR	28
5.8.4 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS	29
5.8.4.1 LACTASA O β -GALACTOSIDASA	29
5.8.4.2 INULINASA	29
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1 EFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO Y USO DE AMORTIGUADORES DE pH EN EL CULTIVO DE <i>K. marxianus</i> EN MEDIO SÓLIDO	31
6.1.1 EFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO EN EL CMS DE <i>K. marxianus</i> CDBBL 278	31
6.1.2 EFECTO DEL AMORTIGUADOR DE pH EN EL CMS DE <i>K. marxianus</i> CDBBL 278	35
6.2 EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPAS UCDC 351, NCYC 587, 1109, 1429, CDBBL 278 y AGUA MIEL A1	38
6.2.1 ANÁLISIS DE RESPIROMETRÍA	38
6.2.2 CONTENIDO DE HUMEDAD, ACTIVIDAD DE AGUA, pH, PRODUCCIÓN DE BIOMASA, CONSUMO DE LACTOSA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA ($Y_{X/S}$)	44
6.2.3 PRODUCCIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (LACTASA E INULINASA)	47
6.3 EFECTO DEL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA Y LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278 EN MEDIO SÓLIDO	52

6.3.1 EFECTO DEL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA EN EL CMS DE <i>K. marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278.....	52
6.3.2 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN LAS VARIABLES PRINCIPALES DEL CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278	56
6.3.2.1 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN LA VELOCIDAD DE FORMACIÓN DE CO ₂ Y EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DEL CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278....	56
6.3.2.2 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN EL CONSUMO DE LACTOSA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA DEL CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278.....	58
6.3.2.3 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN EL pH, HUMEDAD Y Aw DEL CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278.....	60
6.3.2.4 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN LOS RENDIMIENTOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE <i>K. marxianus</i> CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278 EN CMS.....	62
6.4 EFECTO DEL SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO, PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTES NATURALES EN EL CMS DE <i>K. marxianus</i>	66
6.4.1 CMS DE <i>K. marxianus</i> EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO Y PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO.....	66
6.4.2 CMS DE <i>K. marxianus</i> EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTE Y PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD EN RUMIANTES.	69
6.4.2.1 CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPA NCYC 587 Y CDBBL 278 EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO SOPORTE NATURAL.....	69
6.4.2.2 CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPA CDBBL 278 EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO INDUSTRIAL COMO SUSTRATO Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTE NATURAL.....	74

6.4.2.3 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD DEL CMS DE <i>K. marxianus</i> CEPA CDBBL 278 EN REACTOR DE CHAROLAS.	79
6.4.2.3.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO.....	79
6.4.2.3.2 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD.....	81
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	83
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	85
ANEXOS	96
A-1 MEDIOS DE CULTIVO	96
A-2 SOLUCIONES.....	98
A-3 PRUEBAS BROMATOLÓGICAS Y DE DIGESTIBILIDAD	100
A-3.1 PRUEBAS BROMATOLÓGICAS	100
A-3.2 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	103
A- 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SECCIÓN 6.2.....	106
A- 5 BALANCE DE CARBONO	112
A-6 DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> E <i>IN SITU</i>	113
A-7 TRABAJOS DERIVADOS DE NUESTROS ESTUDIOS	116
A-8 PUBLICACIÓN A PARTIR DE NUESTRO TRABAJO	117

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estudios bioquímicos y metabólicos a partir de levaduras del género <i>Kluyveromyces</i>	5
Tabla 2	Enzimas de interés industrial producidas a partir de levaduras del género <i>Kluyveromyces</i>	6
Tabla 3	Comparación entre el CML y el CMS (Durand y Chereau, 1988).	12
Tabla 4	Producción de enzimas por <i>Kluyveromyces</i> en CML	15
Tabla 5	Producción de enzimas por <i>Kluyveromyces</i> en CMS	16
Tabla 6	Cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> estudiadas.	19
Tabla 7	Resultados de la respirometría del CMS de <i>K. marxianus</i> CDBBL 278 con 4 niveles de inoculación.	33
Tabla 8	Parámetros de crecimiento de <i>K. marxianus</i> CDBBL 278 en CMS con 4 niveles de inoculación.	34
Tabla 9	Variables del cultivo de <i>K. marxianus</i> CDBBL 278 en medio sólido con amortiguadores de pH	36
Tabla 10	Comparación de los resultados de las variables del CMS de <i>K. marxianus</i> de las 6 cepas en estudio, con una proporción de urea del 20 % en la fuente de nitrógeno.....	48
Tabla 11	Comparación de rendimientos de actividades enzimáticas reportadas en la literatura en CML y CMS respecto a las obtenidas en este trabajo.....	50
Tabla 12	Efecto del aumento en la concentración de lactosa sobre las fases de crecimiento del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278.....	55
Tabla 13	Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes sobre las fases de crecimiento del CMS de <i>K. marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278.....	65
Tabla 14	Efecto del suero de leche fresco como sustrato sobre las fases de crecimiento del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 con PUF como soporte sintético.....	68
Tabla 15	Efecto del soporte en las variables principales del CMS de <i>K. marxianus</i> cepas NCYC 587 y CDBBL 278 en reactor de charolas.....	73
Tabla 16	Características del CMS de <i>K. marxianus</i> cepa CDBBL 278 usando suero de leche ultrafiltrado industrial y rastrojo de sorgo como soporte en diferentes sistemas de cultivo (36 h de cultivo).....	77
Tabla 17	Análisis bromatológico de materiales fermentados y controles con y sin tratamiento térmico.	80
Tabla 18	A-1 Composición del medio basal.....	96
Tabla 19	A-2 Medios de cultivo	97
Tabla 20	A.4 a. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> UCDCC 351.	106
Tabla 21	A.4 b. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> NCYC 587.....	107
Tabla 22	A.4 c. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> NCYC 1109.....	108
Tabla 23	A.4 d. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> NCYC 1429.....	109
Tabla 24	A.4 e. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de <i>K.</i> <i>marxianus</i> CDBBL 278.....	110

Tabla 25 A.4 f. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* Agua Miel A1..... 111

Tabla 26 A-5. Tabla comparativa de los balances de carbono (C) del CMS de *K. marxianus* empleando suero de leche, PUF, bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo. 112

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de CMS de *Kluyveromyces marxianus* en columnas de fermentación a nivel laboratorio. 21

Figura 2. Sistema de CMS de *Kluyveromyces marxianus* en columnas de fermentación y reactor de charolas. 22

Figura 3. Diagrama esquemático del arreglo del sistema piloto (a). Vista esquemática del reactor de listones helicoidales usado para el CMS con rastrojo de sorgo a escala piloto; entrada de aire (1), salida de aire (2), entrada de inóculo (3), manejo de la flecha. 23

Figura 4. Sistema de CMS de *Kluyveromyces marxianus* en columnas de fermentación, reactor de charolas y reactor de listones usando rastrojo de sorgo y suero de leche ultrafiltrado industrial. 23

Figura 5. Efecto del nivel de inóculo sobre la velocidad de formación de CO₂ durante el CMS de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278..... 32

Figura 6. Tasa de actividad respiratoria (μCO₂) del CMS de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 con cuatro niveles de inoculación. 33

Figura 7. Efecto de amortiguador en el medio de cultivo sobre la velocidad de formación de CO₂ durante el CMS de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278. 35

Figura 8. Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* UCDC 351, en CMS..... 39

Figura 9. Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* Agua Miel A1, en CMS. 39

Figura 10. Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, en CMS..... 39

Figura 11. Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1109, en CMS..... 40

Figura 12. Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1429, en CMS..... 40

Figura 13. Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278, en CMS..... 40

Figura 14. Efecto de la relación SA:U en las fases de retardo de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS. 41

Figura 15. Efecto de la relación de SA:U en la tasa de actividad respiratoria de levaduras de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en CMS.	42
Figura 16. Efecto de la relación SA:U en el CO ₂ total formado de levaduras de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en CMS.	43
Figura 17. Efecto de la relación de SA:U en la producción de biomasa de levaduras de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en CMS.	44
Figura 18. Efecto de la relación de SA:U en el consumo de lactosa de levaduras de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en CMS.	45
Figura 19. Efecto de la relación de SA:U en el rendimiento de biomasa de levaduras de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en CMS.	46
Figura 20. Efecto de la relación de SA:U en el rendimiento de actividad lactasa de levaduras de <i>K. marxianus</i> en CMS.	47
Figura 21. Efecto de la relación de SA:U en el rendimiento de actividad inulinasa del CMS de levaduras de <i>K. marxianus</i>	48
Figura 22. Efecto de la concentración de lactosa en la velocidad de formación de CO ₂ de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.	53
Figura 23. Efecto del aumento en la concentración de todos nutrientes en la velocidad de formación de CO ₂ de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.	56
Figura 24. Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes en la producción de biomasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.	57
Figura 25. Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes en el consumo de lactosa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.	59
Figura 26. Evaluación del pH del cultivo de <i>K. marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 en medio sólido aumentando la concentraciones de todos los nutrientes del medio.	60
Figura 27. Evaluación del contenido de humedad y Aw del cultivo de <i>K. marxianus</i> NCYC 587 y CDBBL 278 en medio sólido aumentando la concentración de todos los nutrientes del medio.	61
Figura 28. Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes del medio en los títulos de actividad lactasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 en CMS.	62
Figura 29. Efecto de la concentración de todos los nutrientes en los títulos de actividad lactasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CDBBL 278 en CMS.	63
Figura 30. Efecto de la concentración de nutrientes en los títulos de actividad inulinasa extracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 en CMS.	64
Figura 31. Efecto de utilización de suero de leche fresco como sustrato sobre la velocidad de formación de CO ₂ de <i>K. marxianus</i> cepas NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.	67
Figura 32. Efecto de utilización de suero de leche como sustrato y bagazo de caña como soporte sobre la velocidad de formación de CO ₂ de <i>K. marxianus</i> cepas NCYC 587 (42 h de cultivo) y CDBBL 278 (24 h de cultivo) en reactor de charolas.	70

Figura 33. Temperatura del CMS de <i>K. marxianus</i> cepa CDBBL 278 en reactor de charolas empleando bagazo de caña de azúcar como soporte.	70
Figura 34. Temperatura del CMS de <i>K. marxianus</i> NCYC 587 en reactor de charolas empleando bagazo de caña de azúcar como soporte.	71
Figura 35. Efecto de utilización de suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato y rastrojo de sorgo como soporte sobre la velocidad de formación de CO ₂ de <i>K. marxianus</i> cepa CDBBL 278 en CMS en columnas de vidrio, reactor de charolas y reactor de listo.	75
Figura 36. Temperatura del CMS de <i>K. marxianus</i> cepa CDBBL 278 en el reactor de charolas empleando rastrojo de sorgo como soporte natural.	75
Figura 37 A-6.1. Cinética del pH en los ensayos de la digestibilidad in vitro con el control de sorgo y el material fermentado con la cepa CDBBL 278 con los tratamientos de estudio.	113
Figura 38 A-6.2. Cinética del nitrógeno amoniacal en los ensayos de la digestibilidad in vitro con el control de sorgo y el material fermentado con la cepa CDBBL 278 con los tratamientos de estudio.	113
Figura 39 A-6.3. Cinética de la digestibilidad in vitro con el control de sorgo y el material fermentado con la cepa CDBBL 278 con los tratamientos de estudio.	114
Figura 40 A-6.4. Cinética de la digestibilidad in situ de la materia seca con los tratamientos de estudio.	114
Figura 41 A-6.5. Cinética de digestibilidad in situ de la fibra detergente neutro con los tratamientos de estudio.	115
Figura 42 A-6.6. Cinética de digestibilidad in situ de la fibra detergente ácida con los tratamientos de estudio.	115

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

PUF	Espuma de poliuretano
Cel /gmh	Células por gramo de materia húmeda inicial
Cel/gms	Células por gramo de materia seca
gmsi	Gramos de materia seca inicial
Vgm	Mililitros de aire por gramo de materia húmeda por minuto
gmh	Gramos de materia húmeda
α	Nivel de significancia
rpm	Revoluciones por minuto
mM	miliMolar
M	Molar
nm	Nanómetro
μmol	Micromol
μmol/mL	Micromol por mililitro
mN	miliNormal
N_T	Nitrógeno total
CO₂	Dióxido de carbono
X	Biomasa
mgCO₂/gmsi	Dióxido de carbono total formado
mgCO₂/h gmsi	Velocidad de formación de dióxido de carbono
mgX/gms	Miligramos de biomasa por gramo de materia seca
μ	Tasa específica de crecimiento (h ⁻¹)
μCO₂	Tasa de actividad respiratoria (h ⁻¹)
UI	Unidades internacionales
UI/gX	Unidades internacionales por gramo de biomasa
IU/gX	International Units by gram of dry matter
gdm	Gram of dry matter
Y_{CO₂X}	Rendimiento de dióxido de carbono
Y_{X/S}	Rendimiento de biomasa
t_{lag}	Tiempo de adaptación
VDFC	Velocidad de formación de CO ₂ (mg/h gmsi)
R²	Coefficiente de correlación
CML	Cultivo en medio líquido
CMS	Cultivo en medio sólido
SL	Suero de leche
SLUI	Suero de leche ultrafiltrado industrial
UCDC	Colección del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la

	Universidad de California, Devis, California.
NCYC	Colección Nacional de Levaduras de Norwich, Reino Unido
CDBBL	Colección de cultivos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del IPN, México.
I	Inulina
ONP	Orto-nitrofenol
ONPG	Orto-nitrofenil- β -d-galactopiranosido
Ln CO₂	Logaritmo natural de dióxido de carbono
MS (%)	Por ciento de materia seca
FDN (%)	Por ciento de fibra detergente neutro
FDA (%)	Por ciento de fibra detergente ácida
MO (%)	Por ciento de materia orgánica
PROT (%)	Por ciento de proteína total
MIN (%)	Por ciento de minerales
DIVMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
DIMS	Digestibilidad <i>in situ</i> de la materia seca
SA	Sulfato de amonio
U	Urea
SA:U	Sulfato de amonio:Urea
Da	Dalton
gCx	Gramos de carbono presentes en la biomasa
gC/CO₂	Gramos de carbono presentes en el CO ₂

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La preocupación por el control de la contaminación ambiental ha motivado a la búsqueda de la forma más conveniente de aprovechamiento de los coproductos de la industria láctea, antes de ser desechados. El suero es el mayor coproducto en la manufactura del queso o caseína de leche, representando el 80-90 % del volumen total de leche transformada (Gurpreet *et al.*, 2009). La eliminación de este coproducto es un reto para la industria quesera, especialmente en países donde una parte pequeña del suero es usado para la producción de concentrados proteicos o permeados y una parte mayoritaria debe ser tratada adecuadamente para evitar problemas de contaminación (Marwaha y Kennedy, 1988) debido a la presencia de un 5-6% de sólidos disueltos, de los cuales la lactosa es el principal constituyente (Sunil *et al.*, 2008).

Los procesos de bioconversión surgen como una alternativa para el aprovechamiento de este coproducto como un sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de producir sustancias útiles en la industria alimentaria, textil, farmacéutica y cosmética (Marwaha *et al.*, 1988).

En este contexto, las levaduras han emergido como una importante fuente de lactasa, debido a que la enzima que produce la levadura tiene un pH óptimo adecuado para la hidrólisis de la lactosa en leche y suero dulce (Panesar *et al.*, 2006).

K. marxianus ofrece algunas ventajas sobre otras levaduras como su alto rendimiento celular, aceptabilidad como microorganismo seguro (GRAS) (Gurpreet *et al.*, 2009) y alta actividad lactasa. También tiene la particularidad de emplear la lactosa como fuente de carbono y energía, un amplio intervalo de temperatura (Hughes *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1986; Banat *et al.*, 1992) de crecimiento (25-52 °C) por lo que es un buen modelo de estudio en cultivos en medio sólido.

El presente trabajo está dividido en 8 capítulos y uno más de anexos. Inicialmente se presenta una introducción donde se da información sobre los problemas que representa para la industria láctea los coproductos de la misma y la capacidad que tienen algunos microorganismos como las levaduras para aprovechar este coproducto.

En la revisión bibliográfica se presenta información relevante que muestra la capacidad de estos microorganismos para ser empleados en diversos procesos de bioconversión. Su importancia fisiológica, bioquímica, metabólica así como sus aplicaciones biotecnológicas como es la generación de compuestos de interés industrial los cuales van desde compuestos aromáticos, producción de etanol, enzimas a través de la conversión de la lactosa. El punto más importante es el hecho de que estos bioprocesos se han llevado a cabo en su mayoría en cultivo en medio líquido. Esto es un antecedente importante para nuestro estudio, ya que justifica la utilización de estos microorganismos ahora en cultivo en medio sólido.

Se plantea un objetivo general y cinco particulares que engloban el trabajo realizado. Para cumplir con los mismos se presentan los materiales y métodos empleados en este estudio.

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos de cultivos en medio sólido a partir de levaduras de la especie *Kluyveromyces marxianus* empleando lactosa como sustrato y espuma de poliuretano como soporte inerte y se determinaron las condiciones ambientales y nutricionales para el crecimiento de dicho microorganismo estudiando el nivel de inóculo, presencia de amortiguador de pH en el medio de cultivo, fuente de nitrógeno, concentración de lactosa y nutrientes.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo se llevaron a cabo cultivos en medio sólido empleando suero de leche ultrafiltrado como sustrato con bagazo de caña y rastrojo de sorgo como soportes naturales. El material fermentado se empleó para llevar a cabo pruebas bromatológicas y de digestibilidad en rumiantes, con la participación del Dr. Marcos Meneses Mayo, del Colegio de Posgraduados. El suero de leche ultrafiltrado y el rastrojo de sorgo fueron donados por el M en B. Fernando Vázquez Mantecón, del establo Michintepc del Municipio de Pedro Escobedo, Qro.

Este trabajo presenta una opción interesante para utilizar el coproducto más importante de la industria quesera para la producción de alimentos para rumiantes. Esto no sólo soluciona un problema ambiental sino que también contribuye a mejorar la sustentabilidad del proceso de la industria láctea sobre todo en pequeñas queserías.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEVADURAS Y SU IMPORTANCIA

Las levaduras son hongos unicelulares, la mayoría perteneciente a los ascomicetos. Estos microorganismos son importantes y ampliamente utilizados en la industria. Se cultivan por el interés en sus propias células, sus componentes celulares y los productos finales que forman durante la fermentación alcohólica. Asimismo, las células de levadura se utilizan en la fabricación de pan y también como fuente de alimento, de vitaminas y de diversos factores de crecimiento. La fermentación a gran escala que produce la levadura es la que hace posible la producción de alcohol para propósitos industriales, aunque se le conoce mejor por su papel en la fabricación de bebidas alcohólicas, como son el vino, la cerveza y los licores (Madigan *et al.*, 2004).

Muchos microorganismos industriales como las levaduras, poseen el sistema bioquímico para sintetizar algunos productos de interés comercial (Hewitt *et al.*, 1984). La producción de etanol como sustancia química a granel es uno de los procesos biocatalíticos más importantes y hoy en día se fabrican casi 400 mil millones de litros de alcohol al año en los Estados Unidos, principalmente por la fermentación de almidón de cereales. Para este propósito se han usado algunas levaduras en la producción de etanol a granel, incluidas las especies *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Candida* (Marwaha *et al.*, 1983), aunque la mayor parte del etanol se produce por *Saccharomyces* (Madigan *et al.*, 2004).

La levadura más conocida es *Saccharomyces cerevisiae*; ésta ha sido empleada para la síntesis de ésteres de acetato durante la fermentación de vino (Lilly *et al.*, 2000); su crecimiento controlado puede producir simultáneamente etanol y lisina (Tanner *et al.*, 1977), mientras las células son una buena fuente de enzimas, proteínas y nucleótidos (Hewitt, *et al.*, 1984).

De igual manera existen otras levaduras de gran importancia industrial como es el caso del género *Kluyveromyces*, el cual tiene la particularidad de emplear la lactosa como fuente de carbono y energía, un intervalo amplio de temperatura (Hughes *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1986; Banat *et al.*, 1992) al cual puede crecer (25-52 °C), con buen rendimiento celular,

aceptabilidad como microorganismo seguro (GRAS) (Gurpreet *et al.*, 2009) y alta actividad lactasa.

2.2 BIOQUÍMICA, METABOLISMO Y FISIOLOGÍA DE *Kluyveromyces marxianus*

La gran mayoría de los estudios publicados sobre *K. marxianus* se centran en su bioquímica, metabolismo o fisiología y también exploran las aplicaciones potenciales de este microorganismo. Típicamente, las células de la levadura han sido cultivadas sobre sustratos específicos y se han llevado a cabo mediciones de las concentraciones de un sustrato o producto además de la concentración celular (Fonseca *et al.*, 2008).

Desde 1970 se han publicado numerosos estudios sobre los aspectos bioquímicos y metabólicos de cepas de *K. marxianus* (Tabla 1). Algunos identifican métodos y clasificaciones apropiadas para *K. marxianus*, lo cual ha sido una tarea demandante. Estos incluyen la observación de que, en contraste con *S. cerevisiae*, el ergosterol es el único esteroide presente en *K. marxianus* (Tabla 1).

En otros casos, *K. marxianus* ha sido usada como fuente de compuestos específicos, principalmente de enzimas. Los ejemplos de este grupo de estudios incluyen la obtención de fructosa-1,6-bisfosfatasa, bifosfato-uridina (UDP), glucosa-4-epimerasa, ácido fosfatasa, amino oxidasa, proteína fosfatasa, carboxipeptidasas y aminopeptidasas (Tabla 1 y 2). También se han llevado a cabo estudios sobre el transporte de azúcares como la lactosa, glucosa, fructosa galactosa y xilosa y ácidos orgánicos como el láctico y málico (Tabla 1). Finalmente, se han llevado a cabo algunos estudios metabólicos con el objetivo de caracterizar ciertos aspectos de *K. marxianus* (Tabla 1).

Tabla 1 Estudios bioquímicos y metabólicos a partir de levaduras del género *Kluyveromyces*

Estudio	Cepa	Referencia
Composición de esteroides	<i>K. fragilis</i> NCYC 100	Penman y Duffus, 1974
Caracterización de la enzima fructose-1,6-bisfosfatasa	<i>K. fragilis</i> ATCC 10022	Toyoda y Sy, 1984
Transporte de lactosa	<i>K. marxianus</i> CBS 397; IGC 2902, CBS 712, IGC 2587, IGC 2671, IGC 3014, NRRL Y-1122, CBS 397.	Van den Broek <i>et al.</i> , 1987; Carvalho- Silva y Spencer-Martins, 1990.
Transporte de ácido láctico	<i>K. marxianus</i> IGC 3014	Fonseca <i>et al.</i> , 1991
Transporte de ácido málico	<i>K. marxianus</i> ATCC 10022, KMS3	Queirós <i>et al.</i> , 1998
Identificación y caracterización de la pared celular de una fosfatasa ácida	<i>K. marxianus</i> Y-610	Yoda <i>et al.</i> , 2000
Caracterización de una amino oxidasa	<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Corpillo <i>et al.</i> , 2003
Mecanismo de transporte de xilosa	<i>K. marxianus</i> ATCC 52486	Stambuk <i>et al.</i> , 2003

Tabla 2 Enzimas de interés industrial producidas a partir de levaduras del género *Kluyveromyces*

Enzima	Aplicación	Cepa	Referencia
Inulinasa	Producción de almíbar de fructosa a partir de inulina	<i>K. fragilis</i> ATCC12424	Workman y Day, 1984 Rouwenhorts <i>et al.</i> , 1988, Rouwenhorts <i>et al.</i> , 1990a,b
		<i>K. marxianus</i> CBS 6397 <i>K. marxianus</i> CBS 6556	
β -galactosidasa	Reducción del contenido de lactosa en alimentos	<i>K. fragilis</i> (varias cepas)	Mahoney <i>et al.</i> , 1975 Goncalves y Castillo, 1982
		<i>K. marxianus</i> NYCY 111 <i>K. marxianus</i> ATCC10022 <i>K. marxianus</i> IMB3 <i>K. marxianus</i> CBS 6556	
β -glucosidasa	Hidrólisis de materiales celulósicos	<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	Raynal y Guerineau, 1984 Leclerc <i>et al.</i> , 1987
Endopoligalacturonasa	Reducción de la viscosidad de productos procesados de frutas	<i>K. marxianus</i> CCT 3172; CCT 3172 (mutante)	Ia y Wheals, 2000
Protein-fosfatasa	Modificación de la calidad de fabricación del queso	<i>K. marxianus</i>	Jolivet <i>et al.</i> , 2001
Aminopeptidasa	Envejecimiento directo de productos de leche y carne	<i>K. marxianus</i>	Ramírez-Zavala <i>et al.</i> , 2004a
Carboxipeptidasa	Reducción del gusto amargo en alimentos que contienen proteína	<i>K. marxianus</i>	Ramírez-Zavala <i>et al.</i> , 2004b

En términos de estudios bioquímicos sobre enzimas de interés industrial, ésta especie ha sido usada para producir inulinasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa y endopoligalacturonasa (Tabla 2). Además de estas, algunas enzimas menos difundidas con potencial de aplicación industrial, como las proteína-fosfatasa, carboxipeptidasas y aminopeptidasas que han sido investigadas recientemente (Tabla 2).

En 1970 también se empezaron a llevar a cabo estudios sobre la influencia de factores ambientales comunes sobre el crecimiento de *K. marxianus*, como un reflejo del interés

eventual durante el uso de esta levadura en aplicaciones industriales. Estudios posteriores reportaron el efecto del pH (Sánchez y Castillo, 1980), concentración de etanol (Bajpai y Margaritis, 1982) y concentración de azúcar (Margaritis y Bajpai, 1983) sobre las cinéticas de crecimiento de *K. marxianus*.

También se ha demostrado que cuando se fija el metabolismo oxidativo en *K. marxianus*, como una función del incremento del flujo glicolítico, la máxima capacidad respiratoria de las células no se ha llevado a cabo (Castillo y Ugalde, 1993).

K. marxianus no crece bajo condiciones estrictamente anaerobias: la formación de etanol está casi exclusivamente ligada a la limitación de oxígeno (Visser *et al.*, 1990; van Dijken *et al.*, 1993; Bellaver *et al.*, 2004). Otros estudios fisiológicos se centran en la floculación (Fernandes *et al.*, 1992, 1993) y la influencia de O₂ sobre la sobrevivencia de ésta levadura (Isenschmid *et al.*, 1995).

K. marxianus tiene una clara ventaja sobre otras levaduras: es termotolerante (Nigam *et al.*, 1997; Hack *et al.*, 1994), tiene una velocidad de crecimiento alta, ausencia de metabolismo fermentativo en presencia de altas concentraciones de azúcar, un amplio espectro de sustratos que puede utilizar y una alta capacidad de producción de enzimas de interés industrial (Castillo, 1990).

2.3 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE *Kluyveromyces marxianus*

El desarrollo de las aplicaciones biotecnológicas con *K. marxianus* han sido motivadas por un número de ventajas en comparación con *K. lactis*. Estas incluyen el hecho de que puede crecer sobre una gran variedad de sustratos y a altas temperaturas, altas velocidades específicas de crecimiento y una menor tendencia a producir etanol cuando se ha expuesto a concentraciones elevadas de azúcar (Rouwenhorst *et al.*, 1988; Steensma *et al.*, 1988; Bellaver *et al.*, 2004).

Aunque algunas levaduras han sido reportadas debido a la producción de aromas, sólo unas pocas de éstas pueden tener una aplicación industrial debido a su calidad GRAS (Medeiros *et al.*, 2000, 2001). *Kluyveromyces sp.* produce compuestos con aroma como ésteres de frutas,

ácidos carboxílicos, cetonas, furanos, alcoholes, alcoholes monoterpenos y acetato de isoamilo en CML (Scharpf *et al.*, 1986, Fabre *et al.*, 1995), siendo el 2-feniletanol (2-PE) el más importante comercialmente hablando (Welsh *et al.*, 1989; Leclercq-Peralt *et al.*, 2004). Este alcohol tiene un aroma a pétalos de rosa y presenta características sensoriales que influyen en la calidad del vino, bebidas destiladas o alimentos fermentados.

También se ha estudiado la influencia de la fuente de carbono (Fabre *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2000), la velocidad de aireación (Medeiros *et al.*, 2001) y la composición del medio de cultivo (Etschmann y Schrader, 2006) sobre la producción de aromas usando *K. marxianus*.

K. marxianus posee la capacidad natural de excretar enzimas. Una de las enzimas importantes que han sido producidas a partir de esta levadura es la pectinasa, o enzima pectinolítica. Ésta está encargada de hidrolizar la pectina. Estas enzimas son usadas industrialmente en la extracción y clarificación de jugos frutales (Schwan *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1999). Otras aplicaciones interesantes están relacionadas con la maceración de vegetales, extracción de aceites y formulación de comida para animales usando mezclas complejas con celulosa para hacer más fácil la asimilación nutricional (Blanco *et al.*, 1999). *K. marxianus* tiene una considerable ventaja sobre *Aspergillus* como fuente de endopoligalacturonasas, siempre y cuando no tenga modificaciones genéticas (Harsa *et al.*, 1993).

En esta levadura, las enzimas pectinolíticas son producidas durante el crecimiento exponencial, pero también toda la poligalacturonasa es secretada en el inicio de la fase estacionaria (Schwan y Rose, 1994; Schwan *et al.*, 1997; Serrat *et al.*, 2004). Entre los parámetros de cultivo, el oxígeno disuelto fue reportado como la clave en la producción de biomasa y endopoligalacturonasa (Wimborne y Rickard, 1978; García-Garibay *et al.*, 1987a). Altas velocidades y rendimientos de producción de biomasa requieren altos niveles de oxigenación, sin embargo, reprime la inducción de la endopoligalacturonasa (Wimborne y Richard, 1978). Se ha reportado que *K. marxianus* exhibe capacidad pectinolítica cuando crece sin agitación y bajo condiciones anaeróbicas (en presencia de inductor) y no hay actividad cuando hay altas velocidades de aireación (Barnby *et al.*, 1990; Schwan y Rose, 1994; García-Garibay *et al.*, 1987a). También se reportó que la temperatura no tuvo un efecto directo sobre la síntesis de ésta enzima pero sí sobre la velocidad de crecimiento y tuvo un efecto indirecto

en la solubilidad del oxígeno (Cruz-Guerrero *et al.*, 1999). Se reportó también que la adición de pectina en un cultivo aerobio en un fermentador desreprimió la producción de la enzima (García-Garibay *et al.*, 1987a). Sin embargo, algunos autores no han encontrado un efecto de la adición de pectina en el medio en una cepa productora de endopoligalacturonasa (Schwan y Rose, 1994; Schwan *et al.*, 1997), mientras que otros autores reportaron el aumento en la producción de la enzima por esta levadura cuando se adicionó pectina (Wimborne y Rickard, 1978; Lim *et al.*, 1980; Cruz-Guerrero *et al.*, 1999). Esta enzima está reportada con una fuerte actividad entre un pH de 4 a 6 con un pH óptimo de 5 (Schwan *et al.*, 1997).

De igual manera, existen reportes de que sólo el 2% de las especies de levaduras reconocidas son capaces de fermentar la lactosa (Barnett *et al.*, 1983), dentro de las cuales se incluye a varias especies del género *Kluyveromyces*. La lactosa es un azúcar presente en la leche y representa además un importante interés biotecnológico y nutricional. Es el principal constituyente sólido del suero, un coproducto en la producción del queso y su eliminación representa una seria preocupación a causa de su alta demanda de oxígeno (González-Siso, 1996). Este azúcar es considerado el inductor primario de la síntesis de la β -D-galactosidasa o lactasa (Furlan *et al.*, 2000).

La β -galactosidasa o lactasa es una enzima importante en la industria farmacéutica y de alimentos (Belem *et al.*, 1998). Esta enzima hidroliza la lactosa en sus monosacáridos glucosa y galactosa y es usada en la preparación de leche deslactosada o suero, en productos usados por gente intolerante a la lactosa y para incrementar el valor y posibilidades de uso del suero, el cual es un potencial contaminante (Belem *et al.*, 1998), que causa serios problemas ambientales si no es tratado adecuadamente (Castillo *et al.*, 1990).

Las fuentes más importantes de lactasa o β -galactosidasa son *K. marxianus* y *K. lactis* (Castillo *et al.*, 1990). Las aplicaciones industriales de procesos basados en la hidrólisis enzimática del suero de leche son escasas porque la enzima de levadura es intracelular, haciendo difícil y costosa su extracción (Gekas *et al.*, 1985, Machado *et al.*, 1990). Por otro lado, los cultivos de *K. marxianus* han sido propuestos, con la finalidad de reducir la contaminación causada por este desecho industrial (Harden, 1996; Aktas *et al.*, 2005), ya que los cultivos aerobios de microorganismos pueden reducir cerca del 90-95 % de su DQO

(Grubb y Mawson, 1993), resultando en bioingredientes de alto valor agregado para la industria alimentaria (Belem *et al.*, 1997).

Se han publicado algunos estudios sobre el efecto de la variación de condiciones de cultivo sobre la producción de β -galactosidasa por *Kluyveromyces marxianus* (García-Garibay *et al.*, 1987b). Algunos de estos han revelado el papel importante de la tensión del oxígeno disuelto (DOT) sobre el proceso (García-Garibay *et al.*, 1987b; Barberis *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2001). En otros estudios han usado el DOT como un parámetro de control de sustrato en cultivos en lote alimentado (Barberis *et al.*, 1997; Barberis *et al.*, 2002).

En este mismo contexto, existen reportes en los que muestran que durante la fase estacionaria del cultivo de *K. marxianus* (cepas CBS 712 y CBS 6556) la actividad lactasa permaneció constante (Rech *et al.*, 1999). En contraste, otros autores reportaron una reducción en la actividad lactasa en la fase estacionaria (Mahoney *et al.*, 1975). La alta actividad lactasa de las cepas CBS 712 y CBS 6556 se reportó a una temperatura de 37 °C, decayendo rápidamente a temperaturas por arriba de 40 °C (Rech *et al.*, 1999), mientras que en la cepa IMB3 la enzima fue activa a 50 °C (Barron *et al.*, 1995).

Otra enzima industrialmente importante es la inulinasa, la cual libera las moléculas de fructosa de la inulina. Esta expresión es inducida por inulina o sacarosa y la enzima puede ser excretada al medio de cultivo o permanecer asociada a la pared celular (Rouwenhorst *et al.*, 1988; Barranco-Florido *et al.*, 2001). *K. marxianus* ha sido ampliamente estudiada por la producción de inulinasa, con el objetivo de producir fructosa a partir de inulina (Cruz-Guerrero *et al.*, 1995). Esta enzima es producida por muchos microorganismos como *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*, *Xantomonas* y *Pseudomonas*. Sin embargo una de las ventajas de usar *Kluyveromyces marxianus* es su resistencia a condiciones de aireación y de estrés (Hewitt *et al.*, 1984).

Esta especie también ha sido propuesta como una fuente de oligonucleótidos, usados como saborizantes de comida, oligosacáridos usados como prebióticos y oligopéptidos inmunoestimuladores adicionados a productos lácteos (Belem *et al.*, 1997; Belem y Lee, 1998, 1999).

Por otra parte, esta especie ha sido reportada como productora de etanol a temperaturas por arriba de los 40 °C, con un crecimiento máximo a 47 °C (Anderson *et al.*, 1986), a 49 °C (Hughes *et al.*, 1984) o 52 °C (Banat *et al.*, 1992). Diferentes procesos han sido usados para la producción de etanol a partir de ésta especie: cultivos con elevadas concentraciones de sustrato (Grubb y Mawson, 1993; Barron *et al.*, 1996), lote alimentado (Ferrari *et al.*, 1994; Gough *et al.*, 1998; Love *et al.*, 1996), sistemas continuos (Love *et al.*, 1998), procesos simultáneos de sacarificación y fermentación adicionando enzimas (Barron *et al.*, 1995b, 1996, 1997; Boyle *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 1995; Ballesteros *et al.*, 2002a,b, 2004), por clonación de genes heterólogos de celulasa (Hong *et al.*, 2007), entre otros. Otras aplicaciones potenciales de ésta especie incluyen su uso como levadura de pan (Caballero *et al.*, 1995) y como agente anticolesterolémico (Yoshida *et al.*, 2004).

2.4 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO (CML) Y EN MEDIO SÓLIDO (CMS)

Los procesos de fermentación pueden ser divididos generalmente en fermentaciones sumergidas (CML) y sólidas (CMS). La mayor diferencia entre estos dos bioprocesos es la cantidad de agua libre en el sustrato. El CMS involucra el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos húmedos, en ausencia o casi ausencia de agua libre entre las partículas. Por supuesto que los microorganismos necesitan agua para crecer y en los sistemas de CMS ellos obtienen agua de la humedad retenida entre las partículas del sustrato (Mitchell *et al.*, 2000).

Dentro de las diferencias que se pueden encontrar en los procesos de CMS en comparación con el CML es que en el primero el medio de cultivo es relativamente simple y los nutrientes están más concentrados, permitiendo emplear reactores pequeños y obteniendo altas productividades volumétricas y productos más concentrados. La baja actividad de agua ayuda a evitar contaminantes, se genera un bajo volumen de efluente, sin embargo, la capacidad de remover el calor metabólico está restringida, conduciendo a problemas de sobrecalentamiento y el control del proceso es difícil debido a las dificultades de las mediciones en línea en comparación con el CML (Cochet *et al.*, 1988; Durand y Chereau, 1988). En la Tabla 3 se resumen las diferencias principales entre estos sistemas.

Los CMS ofrecen numerosas oportunidades en los procesamientos de residuos agroindustriales. Esto es particularmente interesante porque los procesos en estado sólido tienen bajos requerimientos energéticos, consumen menos gasto de agua y son amigables con el ambiente ya que el problema de la disposición de los desechos sólidos es posible de atender con facilidad (Pandey, 2003).

Hay algunos aspectos que deben ser considerados en el desarrollo de un bioproceso en CMS. Estos incluyen la selección de un microorganismo y sustrato adecuados, optimización de los parámetros del proceso y la extracción, aislamiento y purificación del producto (Pandey, 2003). En cuanto a la selección de los parámetros del proceso y su optimización, se incluyen los parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como el tamaño de partícula, el contenido de humedad inicial, pH y el pretratamiento del sustrato, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y tamaño de inóculo, suplementación de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y elementos traza, suplementación de la fuente de carbono e inductores, extracción del producto y su purificación, entre otros (Pandey, 2003).

Tabla 3 Comparación entre el CML y el CMS (Durand y Chereau, 1988).

CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO	CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO
Algunos productos son producidos con bajos contenidos de humedad.	Productos muy variados con una diversidad de microorganismos.
El medio de cultivo es relativamente simple y no puro. Puede contener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento. Pretratamientos simples y sustrato variable.	El medio contiene ingredientes altamente procesados. La reproducibilidad es posible con un medio bien definido.
La baja actividad de agua evita el crecimiento de contaminantes.	La actividad de agua es usualmente muy alta y pueden crecer muchos contaminantes.
Usa medios concentrados, empleo de reactores pequeños, altas productividades volumétricas y rendimientos.	Medios diluidos y grandes volúmenes, bajas productividades volumétricas.
Altas concentraciones de sustrato facilitan alta concentración de producto	Altas concentraciones de sustrato pueden causar problemas de reología.
La aireación requiere menos potencia ya que las presiones son bajas.	Pueden ser requeridas altas presiones de aire. La transferencia del gas a la fase líquida es limitada.
Los mezclados entre partículas es imposible y el crecimiento puede ser limitado por la difusión de nutrientes.	Se pueden hacer mezclados vigorosos y no verse limitada la difusión de nutrientes.

La capacidad de remover el calor metabólico está restringida conduciendo a problemas de sobrecalentamiento.	El alto contenido de agua y la dilución natural facilitan el control de temperatura.
El control de los procesos no es fácil debido a las dificultades de las mediciones en línea y la medición de la biomasa.	Muchos sensores en línea pueden ser empleados. Se pueden adicionar sustancias para controlar el proceso.
Los productos son más concentrados.	Estos procesos requieren mover grandes volúmenes de agua y es costoso. La purificación del producto puede ser fácil.
No se producen grandes volúmenes de líquido remanente.	Se producen grandes volúmenes de líquido remanente.
Las cinéticas de crecimiento y fenómenos de transporte están pobremente caracterizados.	Mucha información cinética y de transporte es capaz de guiar al diseño y operación del reactor.

Los hongos y las levaduras son microorganismos que han sido empleados en procesos de CMS, aunque también los cultivos bacterianos pueden ser bien manejados y manipulados en CMS (Namboothiri y Pandey, 1996; Pandey *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 2000). Los hongos son capaces de crecer sobre sustratos sólidos, mientras que las bacterias y levaduras crecen sobre sustratos sólidos a niveles de humedad del 40-70% (Raghavarao *et al.*, 2003).

La selección de un sustrato adecuado es otro aspecto importante del CMS. El sustrato sólido es no soluble y actúa como soporte físico y como fuente de nutrientes. Éste material puede ser un soporte sólido natural, por ejemplo, residuos agroindustriales o soportes inertes (Pandey *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2001; Hoogschagen *et al.*, 2001). Sin embargo, no es necesario combinar el papel de soporte y sustrato si no más bien reproducir las condiciones de baja actividad de agua y alta transferencia de oxígeno usando un material nutricionalmente inerte embebido en una solución de nutrientes (Pandey, 2003).

Dentro de los problemas que se pueden encontrar en los sistemas de CMS, el calor y la transferencia de calor y masa son de los más importantes. Durante el CMS se genera una gran cantidad de calor, el cual es directamente proporcional a la actividad metabólica del microorganismo (Chahal, 1983). Los materiales sólidos usados en CMS tienen baja conductividad térmica, por lo tanto, la remoción del calor del proceso puede ser muy lenta. La transferencia de calor dentro o fuera del sistema del CMS está estrechamente relacionada con la aireación en el sistema. La temperatura del sustrato es también un factor crítico en el CMS y afecta el crecimiento del microorganismo, la formación de esporas y germinación y la

formación de producto (Moreira *et al.*, 1981). Un alto contenido de humedad resulta en la disminución de la porosidad del soporte, lo cual impide la penetración de oxígeno (Pandey, 2003).

Por otra parte, el agua es un factor crítico en los CMS. La actividad de agua (A_w) de un sustrato tiene una gran influencia sobre la actividad microbiana. En general, los tipos de microorganismos que puede crecer en los sistemas de CMS son determinados por A_w . La A_w del medio ha sido considerada como un parámetro fundamental para la transferencia de masa del agua y solutos a través de las células del microorganismo. El control de éste parámetro puede ser usado para modificar la producción o excreción metabólica de un microorganismo (Pandey, 2003).

Dentro de las aplicaciones del CMS se encuentran:

1. El desarrollo de bioprocesos como la bioremediación y biodegradación de compuestos peligrosos (Classen *et al.*, 2000).
2. La detoxificación biológica de residuos agroindustriales (Brand *et al.*, 2000).
3. Biotransformación de residuos agrícolas para enriquecimiento nutricional (Schmidt *et al.*, 2001).
4. Producción de productos con valor agregado como metabolitos secundarios con actividad biológica, incluidos antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento en plantas, ácidos orgánicos, biopesticidas incluidos micopesticidas y bioherbicidas, biosurfactantes, compuestos aromáticos y enzimas, entre otros (Medeiros *et al.*, 2000).

2.5 CULTIVO DE *Kluyveromyces marxianus* EN CML Y EN CMS

Es importante destacar que se tiene una amplia información de levaduras en general y en particular de *Kluyveromyces marxianus* en cultivo líquido (CML) (Ballesteros *et al.*, 2004; Becerra *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2005; González-Siso, 1994; Inchaurredo *et al.*, 1993; Cruz- Guerrero *et al.*, 1999; Belem *et al.*, 1999), como se observa en la Tabla 4, mientras que los estudios en fermentación en estado sólido (CMS) son muy escasos (Tabla 5), considerando que este tipo de fermentación es aplicable a varios sustratos y las aplicaciones industriales son numerosas (Sato *et al.*, 1985).

A pesar de todas las ventajas que presenta la fermentación en estado sólido sobre la fermentación en cultivo sumergido, hay pocos reportes de ésta especie en CMS, los cuales se centran en la síntesis de inulinasa (Selvakumar y Pandey, 1999; Medeiros y Pandey, 2000; Bender *et al.*, 2006; Mazutti *et al.*, 2006, 2007) y recientemente de lactasa (Tovar-Castro *et al.*, 2008). Por tal motivo consideramos que esta especie es un buen modelo de estudio para profundizar más acerca de su fisiología en CMS y su aplicación en la utilización del principal coproducto de la industria quesera como lo es la lactosa.

Tabla 4 Producción de enzimas por *Kluyveromyces* en CML

Levadura	Sustrato	Producto	Referencia
<i>K. fragilis</i> NRRL-Y-1109	Lactosa 10%	β -galactosidasa	Marison, 1987
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	Inulina 0.25 %	Inulinasa	Rouwenhorts <i>et al.</i> , 1988
<i>K. marxianus</i> CDBBL278	Lactosa/Inulina/Pectina	β -galactosidasa Pectinasa Inulinasa	Espinoza <i>et al.</i> , 1992
<i>K. marxianus</i> CDBBL278	Pectina/Glucosa	Endopoligalacturonasa	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 1999
<i>K. marxianus</i>	Suero deshidratado 15%	Oligonucleótidos	Belem y Lee, 1999
<i>K. marxianus</i> CDBBL 52466	Inulina 1.0 %	Inulinasa	Selvakumar y Pandey, 1999.
<i>K. marxianus</i> NRRL-Y1109	Suero deshidratado 6.6 %	Etanol β -galactosidasa	Cortés <i>et al.</i> , 2005
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Sacarosa 0.4 %	Inulinasa	Khalil <i>et al.</i> , 2004
<i>K. marxianus</i> CDBBL 278 y A1	Inulina 0.25 %	Inulinasa	Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 2006.

Tabla 5 Producción de enzimas por *Kluyveromyces* en CMS

Levadura	Sustrato	Producto	Referencia
<i>K. marxianus</i> ATCC 52466	Inulina 20 g	Inulinasa	Selvakumar y Pandey, 1999
<i>K. marxianus</i> ATCC 10022	Glucosa 10%	Compuestos aromáticos	Medeiros y Pandey, 2000
<i>K. marxianus</i> NRRL Y- 7571	Bagazo de caña suplementado con melaza y licor de maíz	Inulinasa	Bender <i>et al.</i> , 2006
<i>K. marxianus</i> NRRL Y- 7571	Sacarosa 2 %	Inulinasa	Mazutti <i>et al.</i> , 2007
<i>K. marxianus</i> CDBBL 278	Lactosa 5%	Lactasa Inulinasa	Tovar-Castro <i>et al.</i> , 2008

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Existen reportes que indican que sólo el 2% de las especies de levaduras reconocidas son capaces de fermentar la lactosa (Barnett *et al.*, 1983), dentro de las cuales se incluye a las del género *Kluyveromyces*. La lactosa representa un importante interés biotecnológico y nutricional. Es el principal constituyente sólido del suero, un coproducto en la producción del queso y su eliminación representa una seria preocupación ambiental (González-Siso, 1996). Este azúcar es considerado el inductor primario de la síntesis de la β -D-galactosidasa o lactasa (Furlan *et al.*, 2000). *K. marxianus* tiene una clara ventaja sobre otras levaduras: es termotolerante (Nigam *et al.*, 1997; Hack y Marchant, 1998), tiene una velocidad de crecimiento alta, efecto Crabtree negativo, un amplio espectro de sustratos que puede utilizar y una alta capacidad de producción de enzimas de interés industrial (Castillo, 1990).

Existe una amplia información de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en cultivo sumergido (CML) (Ballesteros *et al.*, 2004; Becerra *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2005; González-Siso 1994; Inchaurredo *et al.*, 1993; Cruz- Guerrero *et al.*, 1999; Belem *et al.*, 1999) Mientras que los estudios en cultivo en estado sólido (CMS) son escasos (Selvakumar y Pandey, 1999; Medeiros *et al.*, 2000; Bender *et al.*, 2006; Mazutti M. *et al.*, 2007; Tovar-Castro *et al.*, 2008), además, este tipo de cultivo puede llevarse a cabo con varios sustratos y las aplicaciones industriales son numerosas (Sato *et al.*, 1985). A pesar de todas las aplicaciones potenciales de *Kluyveromyces marxianus*, hace falta información sobre su cultivo en estado sólido. Esto establece la necesidad de estudiar la fisiología de estas levaduras en CMS empleando lactosa como fuente de carbono y energía.

Por lo anterior, nuestra hipótesis es que la utilización de un sistema experimental modelo usando soporte sintético en el CMS de *Kluyveromyces marxianus*, permitirá establecer las bases técnicas para la extrapolación a un sistema de cultivo más cercano a la realidad usando fibras naturales como soportes y suero de leche industrial como fuente de lactosa.

4. OBJETIVOS

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Generar conocimiento fundamental del cultivo de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido empleando soportes sintéticos y naturales y lactosa como fuente de carbono y energía.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar el efecto del nivel de inóculo y de amortiguadores de pH en las fases de retardo, tasas de actividad respiratoria, CO₂ total formado, biomasa, consumo de lactosa, rendimientos de biomasa (Y_{x/s}) y de actividad enzimática del CMS de *K. marxianus*.
- b) Valorar el efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las fases de retardo, tasas de actividad respiratoria, CO₂ total formado, biomasa, consumo de lactosa, rendimientos de biomasa (Y_{x/s}) y de actividad enzimática del CMS de 6 cepas de *K. marxianus*.
- c) Determinar el efecto del aumento en la concentración de lactosa y de nutrientes sobre las variables principales del CMS (fase de retardo, tasa de actividad respiratoria, CO₂ total formado, biomasa, consumo de lactosa, rendimiento de biomasa y de actividades enzimáticas) de *Kluyveromyces marxianus*.
- d) Evaluar el efecto de suero de leche como sustrato en fase de retardo, tasa de actividad respiratoria, CO₂ total formado, biomasa, consumo de lactosa, rendimiento de biomasa y de actividades enzimáticas del CMS de *Kluyveromyces marxianus*.
- e) Valorar el cultivo de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* sobre bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo impregnados con suero de leche industrial.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

5.1.1 MICROORGANISMOS

Se estudiaron 6 cepas del género *Kluyveromyces* (Tabla 6), las cuales fueron proporcionadas por la Dra. Alma Cruz Guerrero de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Las cepas se sembraron en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 30 °C por 24 h, posteriormente se subcultivaron cada dos semanas y se mantuvieron a 4 °C. Su preservación se llevó a cabo a -40 °C empleando etilenglicol como crioprotector.

Tabla 6 Cepas de *Kluyveromyces marxianus* estudiadas.

Cepa	Clave	Producción
<i>K. marxianus</i>	UCDC-C 351	Lactasa, pectinasa
<i>K. marxianus</i>	NCYC 587	Lactasa, pectinasa
<i>K. marxianus</i>	NRRL-Y-1109	Lactasa
<i>K. marxianus</i>	NCYC 1429	Hiperproductora inulinasa
<i>K. marxianus</i>	CDBBL-278	Lactasa, pectinasa, inulinasa
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	Agua Miel A1	Hiperproductora inulinasa

5.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

Se emplearon tres medios de cultivo:

1. Agar Papa Dextrosa (PDA) de la marca BIOXON para el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*.
2. Medio de cultivo lactosado reportado para el cultivo líquido de *Kluyveromyces marxianus* (Cortés *et al.*, 2005, Lukondeh *et al.*, 2005), cuya composición es (g/L): Lactosa 50; extracto de levadura 2.23; (NH₄)₂SO₄ 8.75; KH₂PO₄ 2.72 y MgSO₄·7H₂O 0.518. El medio de cultivo fue balanceado para una producción de biomasa de 21.5 g/L. La composición de los medios y la preparación del suero de leche se detallan en el anexo A-1 y A-2.

5.2 CONDICIONES DE CULTIVO

5.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El inóculo se preparó de la siguiente manera: con la ayuda de un asa se transfirieron células del cultivo en PDA a un matraz Erlenmeyer de capacidad de 250 mL conteniendo 60 ml de medio de cultivo lactosado, pH 5.5 (Cortés *et al.*, 2005, Lukondeh *et al.*, 2005) previamente esterilizado a 121 °C por 15 min. Los matraces fueron incubados a 30 °C por 24 h en un agitador rotatorio a 150 rpm.

5.2.2 TRATAMIENTO DEL SOPORTE

Se trabajó con tres soportes: espuma de poliuretano (PUF), bagazo de caña y rastrojo de sorgo. El PUF se molió con tamaño de malla de 1.5 mm y posteriormente se tamizó hasta obtener un tamaño de partícula de 0.8-1.5 mm. Posteriormente, se lavó tres veces con agua caliente y después una vez con agua fría. Se desechó el agua y se secó en estufa a 60 °C durante 24 h. El bagazo de caña se tamizó hasta obtener un tamaño de partícula de 0.8 mm y se secó en estufa a 60 °C durante 24 h. El rastrojo de sorgo se cortó aproximadamente a 2 cm de largo y se secó en estufa a 60 °C durante 24 h.

5.2.3 CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO (CMS)

5.2.3.1 CMS EN COLUMNAS DE VIDRIO

Los CMS de *Kluyveromyces marxianus* se llevaron a cabo en columnas de vidrio de 21 cm de largo por 4 cm de diámetro (Saucedo-Castañeda, 1994). Se empleó espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte con un tamaño de partícula de 0.8-1.5 mm el cual fue impregnado con el mismo medio empleado para la preparación del inóculo (Fig.1). La concentración de lactosa correspondiente en CMS fue de 50 g/L, ya que en el suero de leche dulce encontramos aproximadamente esa concentración de lactosa (que también corresponde a 170 ± 14 mg por g de materia seca inicial: gmsi), siendo la única fuente de carbono empleada para la producción de biomasa y enzimas (González-Siso, 1996; Castrillo y Ugalde., 1993; Cortés *et al.*, 2005; Belem y Lee, 1993; Castillo, 1990). Cada columna fue empacada con aproximadamente 5 g de materia seca (gms), previamente esterilizada (121 °C por 15 min) e inoculada con una suspensión de levaduras de 2.5×10^6 cel/gms. A las columnas se les pasó un flujo de aire previamente humedecido de 0.5 ml de aire por gramo de materia húmeda por minuto (0.5

vgm). El contenido de humedad inicial y A_w fue de 75% y 0.997, respectivamente; las columnas se incubaron a 30 °C. Los tiempos de cultivo variaron en cada estudio y la toma de muestras se realizó al inicio y final del cultivo en todos los casos, excepto en el estudio de aumento en la concentración de todos los nutrientes en el medio de cultivo. El tiempo de cultivo se determinó cuando se alcanzaba la tercera parte de la velocidad máxima de producción de CO_2 . Los ensayos en columna se hicieron por triplicado como experimentos independientes y el análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando la metodología de Duncan con un $\alpha < 0.05$.

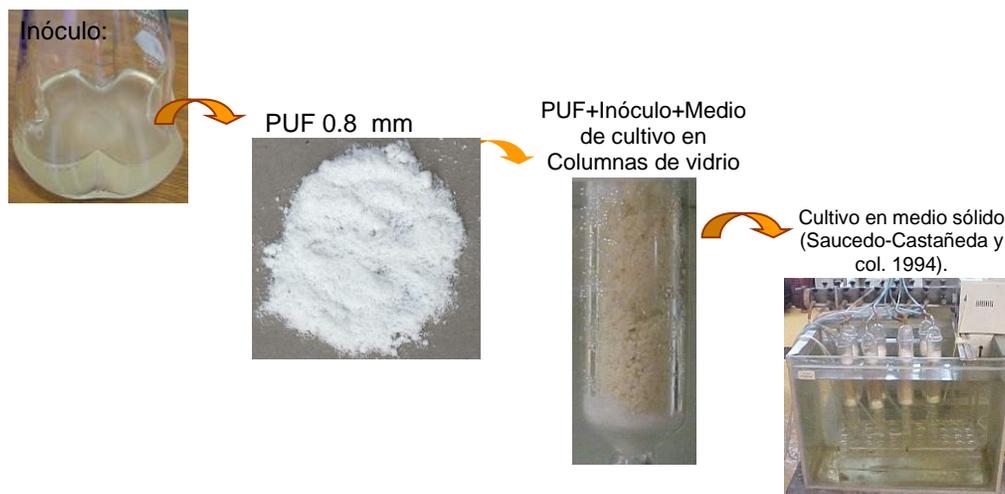


Figura 1 Sistema de CMS de *Kluyveromyces marxianus* en columnas de fermentación a nivel laboratorio.

5.2.3.2 CMS EN REACTOR DE CHAROLAS Y REACTOR DE LISTONES

También se llevaron a cabo CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 tanto en columnas de vidrio como en reactor de charolas empleando bagazo de caña como soporte (Fig.2) y posteriormente sólo se trabajó con la última cepa llevando a cabo CMS tanto en columnas de vidrio así como en reactor de charolas y reactor agitado por listones helicoidales (Nava *et al.*, 2006) empleando rastrojo de sorgo como soporte natural (Fig.3) y suero de leche ultrafiltrado, proporcionados por el M. en B. Fernando Vázquez Machado del Rancho de Pedro Escobedo, Establo Michintepec, Querétaro, como sustrato, el cual contenía 4.8 % de

lactosa (p/v) en su composición. Cada columna fue empacada con aproximadamente 25 gms, previamente esterilizada (121 °C por 15 min) e inoculada con una suspensión de levaduras de 2×10^6 cel/gms. A las columnas se les pasó un flujo de aire previamente humedecido de 0.5 ml de aire por gramo de materia húmeda por minuto (0.5 vgm). El contenido de humedad inicial y A_w fue de 75% y 0.998, respectivamente; las columnas se incubaron a 30 °C. Los cultivos se realizaron por triplicado. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando la metodología de Duncan con un $\alpha < 0.05$. En el caso del reactor de charolas, se empacaron 4 charolas (dimensiones de 3.5x26.5x20.5 cm), cada una con aproximadamente 125 gms, un contenido de humedad de 75%, una A_w de 0.997 y una suspensión de levaduras de 5×10^6 cel/gms y se les hizo pasar un flujo de aire previamente humedecido de 1.5 vgm. La temperatura de las charolas se midió en el centro de éstas y a la mitad del lecho y en la corriente de aire de salida del reactor se midió la producción de CO_2 .

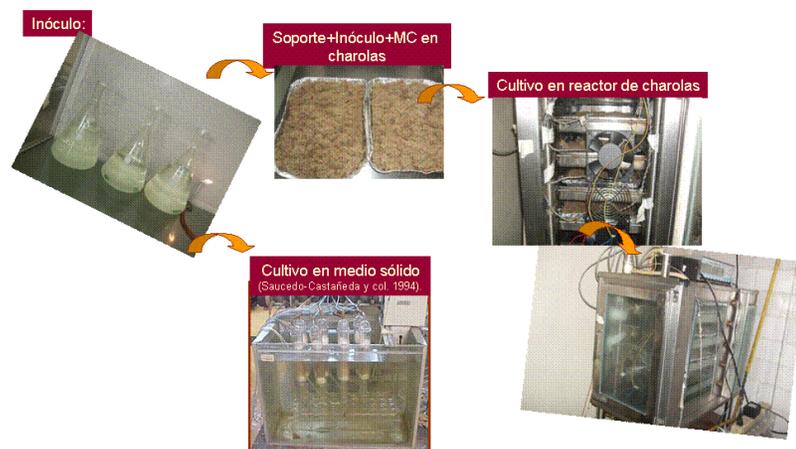


Figura 2 Sistema de CMS de *Kluyveromyces marxianus* en columnas de fermentación y reactor de charolas.

El reactor de listones (Fig.3) se empacó con aproximadamente 2.5 kg de materia seca (Fig.4), usando como soporte rastrojo de sorgo, suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato y se inoculó con una suspensión de levaduras de 5×10^6 cel/gms, se aireó con 1.5 vkgm y un contenido de humedad de 75%. La temperatura de la chaqueta del reactor se mantuvo a 30 °C.

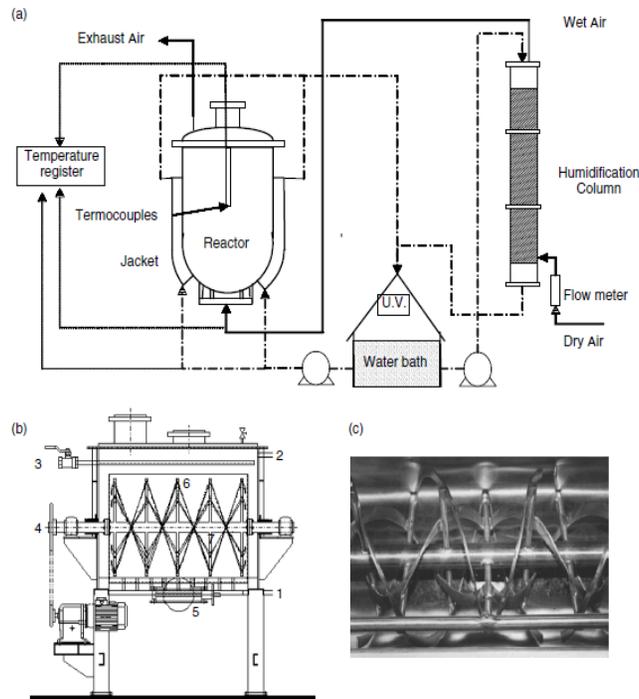


Figura 3 Diagrama esquemático del arreglo del sistema piloto (a). Vista esquemática del reactor de listones helicoidales usado para el CMS con rastrojo de sorgo a escala piloto; entrada de aire (1), salida de aire (2), entrada de inóculo (3), manejo de la flecha.

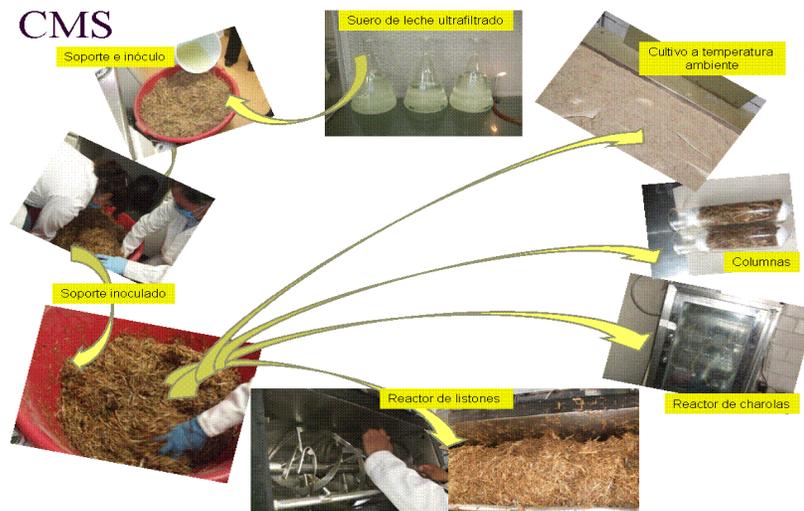


Figura 4 Sistema de CMS de *Kluyveromyces marxianus* en columnas de fermentación, reactor de charolas y reactor de listones usando rastrojo de sorgo y suero de leche ultrafiltrado industrial.

5.3 CULTIVO DE *K. marxianus* EN MEDIO SÓLIDO EMPLEANDO 4 NIVELES DE INOCULACIÓN Y USO DE AMORTIGUADORES.

Se realizaron ensayos preliminares para determinar el nivel de inoculación. Para este propósito se empleó únicamente la cepa de *K. marxianus* CDBBL 278. Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el apartado 5.2.3, sólo que en este caso se estudiaron 4 niveles de inoculación los cuales fueron: 2.5×10^4 ; 2.5×10^5 ; 2.5×10^6 y 2.5×10^7 cel/gms. El CMS se llevó a cabo a un pH inicial de 5.5, 75% de humedad y A_w de 0.998, empleando PUF como soporte. De igual manera, se llevaron a cabo CMS de *K. marxianus* CDBBL 278 empleando dos amortiguadores de pH en el medio de cultivo: amortiguador de fosfato de potasio 25 mM y amortiguador de acetato de sodio 25 mM. Las condiciones de cultivo fueron como se menciona en la sección 5.2.

5.4 CULTIVO DE *K. marxianus* EN SÓLIDO VARIANDO LA FUENTE DE NITRÓGENO

Se estudió el efecto de la utilización de mezclas de urea y sulfato de amonio sobre el cultivo de las 6 cepas en estudio con la finalidad de amortiguar los cambios de pH. El total de la fuente de nitrógeno provino de mezclas de sulfato de amonio (SA) y urea (U) en las siguientes proporciones (SA:U): 100:0; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80 y 0:100. Los medios fueron isonitrogenados con $N_T = 1.85$ g/L.

5.5 CULTIVO DE *K. marxianus* EN MEDIO SÓLIDO AUMENTANDO LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Se trabajó bajo las mismas condiciones que en el apartado 5.2.3.1, empleando el medio de cultivo lactosado con una mezcla de SA y U en proporción 80:20 en la fuente de nitrógeno y se aumentó la concentración de lactosa de 50 a 100 y 150 g/L (correspondientes a 195, 314 y 518 mg/gms, respectivamente) para estudiar su efecto sobre las variables del cultivo de levaduras en medio sólido. Por otra parte, se trabajó bajo las mismas condiciones que en el apartado 5.2.3.1, empleando el medio de cultivo lactosado con una mezcla de SA y U en proporción 80:20 en la fuente de nitrógeno (1X) y se aumentó la concentración de todos los nutrientes del medio 1X, 2X y 3X para estudiar su efecto sobre las variables principales del cultivo de levaduras en medio sólido.

5.6 CMS DE *K. marxianus* EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO, PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTES SINTÉTICOS

Se llevaron a cabo CMS con *K. marxianus* cepas NCYC 587 y CDBBL 278, empleando suero de leche ultrafiltrado preparado a partir de leche entera Santa Clara (Anexo A-1 y A-2) como sustrato, el cual contenía 48 g/L de lactosa (aproximadamente 184 mg/gms). Posteriormente, se llevaron a cabo CMS de *K. marxianus* cepa NCYC 587 y CDBBL 278 en columnas de fermentación, reactor de charolas y reactor de listones empleando suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato (conteniendo 48 g/L de lactosa) proveniente del Establo Michintepec, Qro., bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo como soportes naturales y un tamaño de inóculo de 5×10^6 cel/gms para evitar problemas de contaminación en los reactores.

5.7 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Una vez terminado el cultivo el material fermentado de las columnas, del reactor de charolas y del reactor de listones, se vació y se colocó en bolsas de polipropileno que se almacenaron a 10 °C hasta su utilización. El procedimiento para el tratamiento de las muestras se presenta a continuación:

Se pesaron 4 g de materia fermentada y se adicionaron 20 ml de Tween 80 al 0.01%, se mezcló durante 5 min con agitador magnético. La biomasa se separó de la materia fermentada mediante prensado y filtrado a través de un tamiz de acero inoxidable de malla No. 100. El filtrado fue centrifugado por 10 min a 6500 rpm. El sobrenadante fue empleado para determinar la lactosa y las actividades enzimáticas extracelulares, mientras que el precipitado fue secado a 60 °C por 24 h para determinar la biomasa (Carrizales y Rodríguez, 1981). En muestras separadas, el extracto enzimático intracelular se obtuvo de la biomasa precipitada después de centrifugación, como se mencionó arriba. El precipitado fue sometido a rompimiento celular empleando perlas de vidrio en un rompedor ultrasónico (Mini-BeadBeater, Sartorius). Posteriormente, se adicionó 1 ml de buffer de fosfatos de potasio 25 mM, pH 5.5 y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue empleado para el análisis de las actividades enzimáticas intracelulares.

Por otra parte, el resto del material fermentado con rastrojo de sorgo se dividió en dos porciones y para cada sustrato empleado se hizo un tratamiento con y sin temperatura con vapor directo en autoclave a 90 °C por 10 min. Una vez concluido este tiempo el material tanto tratado térmicamente como sin tratar se secó a temperatura ambiente por 72 h y una vez seco se empleó para las pruebas bromatológicas y de digestibilidad en rumiantes.

5.8 TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.8.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

Se determinó la producción de CO₂ como medida indirecta del crecimiento de las cepas de *Kluyveromyces marxianus* (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). La concentración de CO₂ que salía de las columnas de fermentación se monitoreó en línea usando un cromatógrafo de gases (GowMac 580, Gow-Mac Instrumentation Co., Bethlehem, PA, USA), equipado con un detector de conductividad térmica y un inyector automático; una columna concéntrica de separación de gases (CTRI, Alltech) y un programa integrador (Chroma Biosystèmes, France). Los resultados se expresaron en términos de velocidad de formación de dióxido de carbono (mgCO₂/h gmsi), CO₂ total formado (mgCO₂/g msi), fase de retardo (h) y de la tasa específica de CO₂ o tasa de actividad respiratoria (h⁻¹).

Los datos de concentración de CO₂ fueron utilizados para estimar las velocidades de producción de CO₂. Considerando la definición de μ (ec. 1) y el rendimiento $Y_{CO_2/x}$ (ec. 2) constante en la fase de crecimiento exponencial, se obtiene (ec. 3):

$$\mu = \left(\frac{1}{x} \right) \left(\frac{dx}{dt} \right) \quad (\text{ec. 1})$$

Considerando que $Y_{CO_2/x}$ es constante, la ecuación 1 se puede reescribir:

$$\mu = \left(\frac{1}{x} \right) \frac{dx}{dt} = \left(\frac{1}{CO_2} \right) \frac{dCO_2}{dt} \quad (\text{ec. 2})$$

μ tiene el subíndice CO₂ para indicar que fue estimada a través de mediciones de CO₂

$$\mu_{CO_2} = \left(\frac{1}{CO_2} \right) \frac{dCO_2}{dt} \quad (\text{ec. 3})$$

Al integrar esta ecuación se obtiene:

$$\mu_{CO_2} = \frac{\text{Ln} \left(\frac{CO_{2f}}{CO_{2i}} \right)}{\Delta t} \quad (\text{ec.4})$$

Si las consideraciones anteriores son correctas, el valor de μ será el valor de la pendiente de la gráfica del logaritmo de la concentración de CO_2 contra el tiempo (ec. 4), en la fase de crecimiento acelerado (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Esta estimación es muy útil para caracterizar los cultivos en medio sólido, cuando no es posible la determinación directa de la biomasa.

El t_{lag} es la duración de la fase de retardo y se calcula en la intersección de la tangente a la curva del $\text{Ln } CO_2$ en la etapa de crecimiento exponencial (μ_{CO_2}) con el valor del $\text{Ln } CO_2$ prácticamente constante de las primeras horas de cultivo.

5.8.2 DETERMINACIÓN DE LACTOSA

El consumo de lactosa se midió durante los cultivos de *Kluyveromyces marxianus* mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) determinando los azúcares totales a 490 nm. Una vez separada la biomasa se tomó 1 ml del sobrenadante centrifugado y se empleó para el análisis de azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico. Este método está basado en la reacción de los carbohidratos con fenoles en presencia de un ácido fuerte. Bajo condiciones fuertemente ácidas, los carbohidratos se deshidratan y forman furfural e hidroximetilfurfural, los cuales se condensan con el fenol. La reacción completa resulta en la formación de un complejo color amarillo-naranja que se puede leer a 490 nm (para las hexosas) y a 480 nm (para pentosas). El color producido es permanente y es útil para determinar pequeñas cantidades de azúcares y sus metilderivados, oligosacáridos y polisacáridos extraídos con diferentes disolventes.

Método:

Se adicionan 2 ml de la solución de carbohidratos en tubo y 0.5 ml de fenol al 80%, rápidamente se incorporan 5 ml de H₂SO₄ concentrado con agitación continua y se deja reposar durante 10 min. Se agita nuevamente y se colocan los tubos en baño maría a 25-30 °C durante 10-20 min. Se leen las absorbancias del color característico amarillo-naranja a 490 nm para hexosas y 480 nm para pentosas y ácidos urónicos. Los blancos se preparan sustituyendo la solución de azúcares por agua destilada. Las soluciones se preparan por triplicado.

Curva de calibración: la concentración de azúcares se determinó con ayuda de una curva patrón de 0 a 0.1 g/L. a partir de la solución patrón de lactosa de 10 g/L se prepararon estándares de 0, 10, 20 hasta 100 µL. Los coeficientes de regresión de la curva de calibración fueron mayores a 0.998.

Este método sólo se aplicó para las muestras de los estudios de los niveles de inoculación y de los amortiguadores de pH. Posteriormente, esta técnica se reemplazó por HPLC (Perkin Elmer Binary LC Pump 250) empleando un detector de índice de refracción (Perkin Elmer LC-30 RI Detector), una columna Rezex de 300 mm (Phenomenex) y como fase móvil se empleó H₂SO₄ 5 mN a un flujo de 0.5 mL/min y 50 °C.

5.8.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD, pH, Aw Y CONCENTRACIÓN CELULAR

El contenido de humedad del material fermentado se determinó empleando una termobalanza Ohaus, previamente tarada. El pH se determinó empleando un potenciómetro marca Conductronic pH120, previamente calibrado. Se utilizó un instrumento AQUA-LAB (CX-2) para determinar la actividad de agua (Aw) de una porción de materia húmeda fermentada (0.5 g). La concentración de células se estimó tomando 100 µL del inóculo y se llevaron a 1000 µL con agua destilada. Posteriormente, se tomaron 300 µL de la suspensión y se procedió al conteo en microscopio Olympus empleando un hematocitómetro Neubauer.

5.8.4 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

5.8.4.1 LACTASA O β -GALACTOSIDASA

Una vez que se obtuvieron los extractos enzimáticos intracelulares se procedió a la determinación de la actividad enzimática de lactasa (Barberis y Segovia, 2002) de la siguiente manera: un volumen de 0.2 ml de orto-nitrofenil- β ,d-galactopiranosido 34 mM (preparado en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M, en solución de magnesio y manganeso 0.1 M, pH 6.6) se adicionó a 0.1 ml de extracto enzimático intracelular. El volumen final se ajustó a 3 ml con amortiguador de fosfatos de potasio (anexo A-2). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 3 min y la densidad óptica (420 nm) fue registrada mediante un espectrofotómetro Shimadzu TCC-240. El blanco contenía 0.2 ml de orto-nitrofenil- β ,d-galactopiranosido 34 mM y 2.8 mL de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M. Se calculó la pendiente en el intervalo de 0.5 a 3.5 min de reacción.

Curva de calibración: la hidrólisis del ONPG se determinó con ayuda de una curva patrón de 0.2 a 6.5 μ mol/ml a partir de la solución patrón de ortonitrofenol (ONP) de 1.8 g/L. Los blancos se corrieron simultáneamente sin el extracto enzimático. La curva de calibración dio un coeficiente de regresión de 0.998. Una unidad internacional de actividad lactasa (UI) fue definida como la cantidad de enzima que liberó 1 μ mol de ONP por minuto bajo estas condiciones de estudio.

5.8.4.2 INULINASA

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos intra y extracelulares se procedió a la determinación de la actividad enzimática de inulinasa por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944, Selvakumar y Pandey, 1999), corriendo un blanco de enzima para eliminar los azúcares presentes en el extracto enzimático de la siguiente manera:

- Se mezclaron 0.2 ml de inulina al 1% (disuelta en amortiguador de acetato de sodio 100 mM, pH 4.5) y 0.05 ml de extracto enzimático.
- Se mezclaron 0.2 ml de amortiguador de acetatos de sodio (100 mM, pH 4.5) y 0.05 ml de extracto enzimático (blanco de enzima).
- Se incubaron a 37 °C por 15 min. Después de la incubación, se les adicionó 0.25 ml del reactivo de Somogyi y los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min.

- Se enfriaron y se les adicionó 0.25 ml del reactivo de Nelson y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente se les adicionaron 4 ml de agua destilada.
- El incremento de la absorbancia por la aparición de grupos reductores de fructosa fue medido en un espectrofotómetro Shimadzu TCC-240 a 580 nm.

Se preparó una curva de calibración con solución de fructosa 100 mM en amortiguador de acetatos pH 4.5. Los blancos se corrieron simultáneamente sin el extracto enzimático. La curva de calibración dio un coeficiente de regresión de 0.988.

Una unidad internacional (UI) de actividad inulinasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcares reductores de fructosa por minuto bajo estas condiciones de estudio.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO Y USO DE AMORTIGUADORES DE pH EN EL CULTIVO DE *K. marxianus* EN MEDIO SÓLIDO

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO Y USO DE AMORTIGUADORES DE pH EN EL CULTIVO DE *K. marxianus* EN MEDIO SÓLIDO

K. marxianus cepa CDBBL 278 fue seleccionada en esta primera etapa debido a que es una levadura que presenta una concentración importante de biomasa y de actividades enzimáticas en CML empleando medios lactosados. El objetivo de este estudio fue determinar si la levadura era capaz de crecer en CMS y obtener las condiciones de cultivo óptimas para su desarrollo en este tipo de sistemas. Con este propósito, se llevaron a cabo CMS empleando cuatro niveles de inoculación y posteriormente dos amortiguadores de pH, con espuma de poliuretano como soporte inerte, el cual fue impregnado con medio de cultivo conteniendo lactosa (50 g/L, que correspondieron a aproximadamente 170 ± 14 mg/gms). El tiempo de cultivo para los niveles de inoculación de 2.5×10^5 , 2.5×10^6 y 2.5×10^7 cel/gms fue de 36 h y para el inóculo de 2.5×10^4 cel/gms fue de 60 h. Solo se tomaron muestras al inicio y final de cada cultivo para determinar si la levadura era capaz de emplear la lactosa para producir biomasa y actividad lactasa. El rendimiento de actividad enzimática se presenta en UI/gX para poder comparar los resultados con los reportados en CML ya que no existían reportes hasta este momento de ello en CMS. Los experimentos se hicieron por triplicado y se trabajó con unidades experimentales independientes. Los resultados se presentan a continuación.

6.1.1 EFECTO DEL NIVEL DE INÓCULO EN EL CMS DE *K. marxianus* CDBBL 278

La formación de CO₂ es un método indirecto para estimar el crecimiento de la biomasa (Saucedo-Castañeda, 1994), esto permite determinar la velocidad de formación del CO₂ (VFDC, expresado en mg CO₂/h gmsi) automáticamente en línea y sin perturbar el cultivo. El total de CO₂ formado resulta de la integración de la VFDC en el tiempo, el cual puede ser transformado en biomasa usando un coeficiente de rendimiento (Y_{X/CO_2}). El análisis de estos datos permitieron identificar las diferentes fases del cultivo: fase de retardo, estacionaria y crecimiento de esta levadura en CMS.

En la Figura 5 se presentan los perfiles de la velocidad de formación de CO₂ durante el cultivo de la cepa CDBBL 278 empleando 4 niveles de inoculación (2.5×10^4 , 2.5×10^5 , 2.5×10^6 y

2.5×10^7 cel/gms). Se observa que en la medida en que el inóculo es menor la fase de retardo (lag) es mayor, siendo de casi 25 h para el nivel de inoculación más bajo (2.5×10^4 cel/gms). En contraste, para los niveles de inoculación mayor 2.5×10^6 y 2.5×10^7 cel/gms, la fase de retardo es cercana a 12 y 6 h, respectivamente. La lactosa se consumió en un 90% en todos los casos, pero la duración del cultivo fue de 24 h más al nivel de inoculación más bajo.

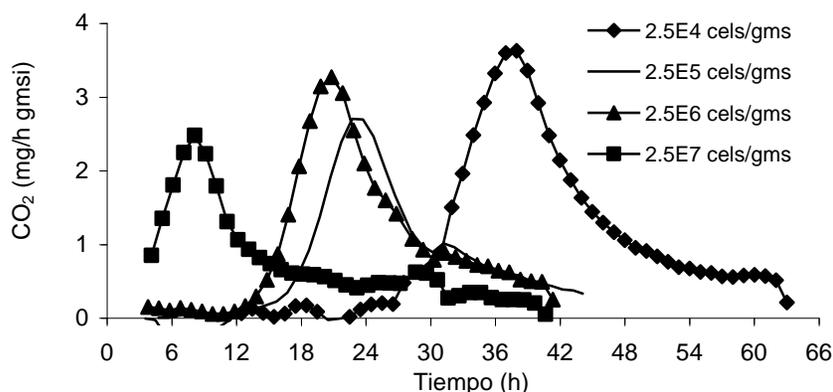


Figura 5 Efecto del nivel de inóculo sobre la velocidad de formación de CO₂ durante el CMS de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278.

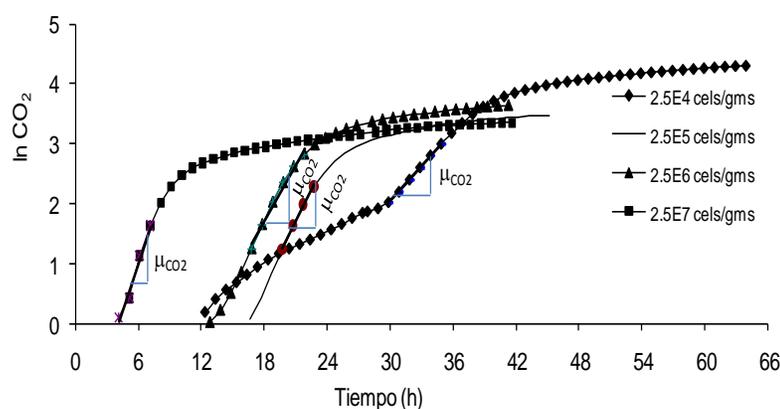
En la Tabla 7 se presenta la fase de retardo, la tasa de actividad respiratoria, la regresión lineal usada para la estimación de μ_{CO_2} así como el CO₂ total producido por *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 en CMS con 4 niveles de inoculación. La fase de retardo se incrementó a medida que el nivel de inóculo disminuyó observándose una fase lag de 31 h para el nivel de inoculación más pequeño (2.5×10^4 cel/gms). Esto se puede explicar debido a que la concentración de CO₂ en el flujo de aire depende de la población microbiana; ésta disminuyó cuando la población celular fue baja. El CO₂ total formado no se ve afectado por los niveles de inoculación estudiados, excepto para el caso de 2.5×10^4 cel/gms, lo cual podría ser explicado por el desarrollo de contaminantes debido a una concentración baja de levaduras en el inóculo.

Tabla 7 Resultados de la respirometría del CMS de *K. marxianus* CDBBL 278 con 4 niveles de inoculación.

Nivel de inoculación (cel/gms)	Fase lag (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg CO ₂ /g msi)
2.5x10 ⁴	31±0.1 ^d	0.3±0.01 ^b	0.99	55.0±0.01 ^a
2.5x10 ⁵	16.7±0.1 ^c	0.34±0.01 ^b	0.99	34.4±0.01 ^b
2.5x10 ⁶	12.4±2.2 ^b	0.32±0.03 ^b	0.99	34.6±0.04 ^b
2.5x10 ⁷	5.1±0.1 ^a	0.45±0.1 ^a	0.98	34.5±0.03 ^b

Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.5$).

La tasa específica de crecimiento (μ) se estimó a través de la tasa de actividad respiratoria (μ_{CO_2}), calculada a partir del logaritmo natural de la producción total de CO₂, determinando la pendiente (μ_{CO_2}) en la zona lineal (Fig. 6). La R² corresponde a la regresión lineal usada para la estimación de μ_{CO_2} (Fig. 6). El valor máximo de μ_{CO_2} se alcanzó cuando se empleó un nivel de inoculación de 2.5x10⁷ cel/gms y fue menor con los niveles de inoculación más bajos (2.5x10⁴, 2.5x10⁵ y 2.5x10⁶ cel/gms) en donde no se observaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

**Figura 6 Tasa de actividad respiratoria (μ_{CO_2}) del CMS de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 con cuatro niveles de inoculación.**

En la Tabla 8 se presenta la biomasa producida, el rendimiento de biomasa, la concentración y consumo de lactosa y la actividad lactasa intracelular de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 en CMS con 4 niveles de inoculación. El mejor rendimiento se presentó al emplear 2.5x10⁷ células/gms, mientras que el mayor consumo de lactosa se obtuvo con el inóculo más bajo, el cual tuvo el mayor tiempo de cultivo. En ningún estudio se detectó actividad de lactasa

extracelular, mientras que el rendimiento de actividad enzimática intracelular obtenido con un nivel de inoculación de 2.5×10^6 cel/gms representa sólo el 36 % de la reportada en la literatura (1590 UI/gX) para esta cepa en CML (Espinoza *et al.*, 1992). Sin embargo, se tendrían que haber llevado a cabo cinéticas para determinar el tiempo en que se obtiene el mayor rendimiento de actividad enzimática y sin este estudio los valores obtenidos no reflejan el efecto que tiene el nivel de inóculo sobre las actividades enzimáticas.

Tabla 8 Parámetros de crecimiento de *K. marxianus* CDBBL 278 en CMS con 4 niveles de inoculación.

Nivel de inóculo (cel/gms)	Biomasa producida (mg/gms)	Rendimiento ($Y_{X/S}$)	Lactosa (mg/gms)		Consumo lactosa (%)	Rendimiento de actividad lactasa (UI/gX)
			0 h	36 h		
2.5×10^4	46.3±1.8 ^a	0.27±0.002 ^b	180.8±2 ^a	10±0.9 ^a	94.5±0.4 ^a	2.1±0.01 ^c
2.5×10^5	44.2±1.2 ^a	0.30±0.001 ^b	165.6±0.1 ^c	13.7±0.03 ^b	91.7±0.2 ^b	35±0.01 ^b
2.5×10^6	45.3±1.3 ^a	0.28±0.01 ^b	173.1±2.3 ^b	14±1.5 ^b	91.9±1 ^b	580.2±0.02 ^a
2.5×10^7	52.2±9 ^a	0.36±0.03 ^a	174.5±0.3 ^b	16.7±1 ^c	90.5±0.1 ^b	15±0.02 ^b

Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.5$).

Se decidió emplear el nivel de inoculación de 2.5×10^6 céls/gms para estudios posteriores.

6.1.2 EFECTO DEL AMORTIGUADOR DE pH EN EL CMS DE *K. marxianus* CDBBL 278

En este estudio se trabajó con dos amortiguadores de pH, amortiguador de fosfatos de potasio 25 mM y amortiguador de acetatos de sodio 25 mM y el medio de cultivo sin amortiguador de pH. Se empleó PUF como soporte sintético y un nivel de inóculo de 2.5×10^6 cel/gms.

En la Figura 7 se muestran los perfiles de la velocidad de formación de CO_2 durante el cultivo de *Kluyveromyces marxianus* cepa CDBBL 278 en medio sólido en las siguientes condiciones: sin amortiguador (42 h de cultivo), con amortiguador de acetato de sodio 25 mM (36 h de cultivo) y con amortiguador de fosfato de potasio 25 mM (36 h de cultivo). Al emplear amortiguador de fosfato de potasio, se identificaron claramente las diferentes fases de crecimiento de la levadura durante el CMS; se observó una fase de retardo corta ($9.6 \text{ h} \pm 2.1 \text{ h}$), la máxima velocidad de formación de CO_2 (3.1 mg/h gmsi) se observó a las 18 h de cultivo, mientras que la tasa de actividad respiratoria fue de 0.3 h^{-1} . Estos valores son similares a los reportados en la tabla 7 con el nivel de inóculo de 2.5×10^6 cel/gms. Mientras que la velocidad de formación de CO_2 al emplear acetato de sodio se vio subestimada, reflejándose esto en la producción de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* cepa CDBBL 278 (Tabla 9).

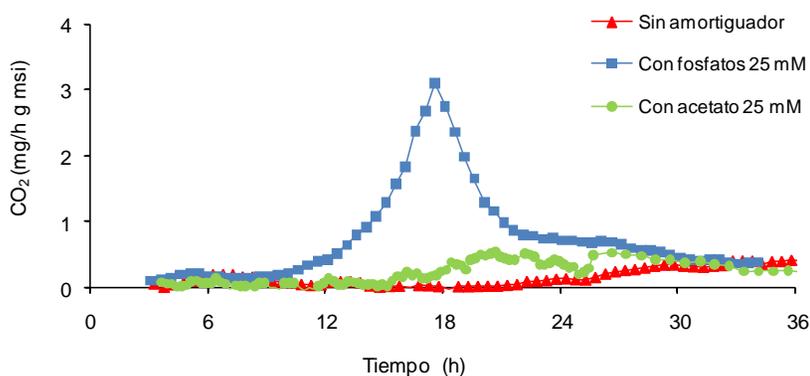


Figura 7 Efecto de amortiguador en el medio de cultivo sobre la velocidad de formación de CO_2 durante el CMS de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278.

Bajo las condiciones estudiadas, en todos los casos, no hubo diferencia significativa en el pH final alcanzado al tratar el cultivo con y sin amortiguador de fosfatos y acetatos, el cual fue cercano a 2.7. Esto probablemente pueda deberse a que esta levadura produce ácidos orgánicos que acidifican el medio (Mahoney, 1998). Sin embargo, es importante mencionar que el poder

amortiguador de una solución está dado por su concentración y en este caso las concentraciones empleadas con ambos amortiguadores fueron bajas (25 mM).

En la Tabla 9 se presentan los resultados de la biomasa producida, consumo de lactosa y rendimiento de biomasa formada por lactosa consumida ($Y_{X/S}$). La mejor producción de biomasa así como el mejor rendimiento y consumo de lactosa se obtuvieron con el amortiguador de fosfato de potasio en el medio de cultivo.

El fósforo presente en esta sal es fuente de ATP y favorece la producción de lactasa, sin embargo en este estudio no se encontró esta actividad enzimática. Esto se puede deber a que la enzima pierde toda la actividad a pH 3-4 y a pH básico es capaz de mantener una alta actividad hasta pH de 10.7 (Ladero *et al.*, 2005). Sin embargo, también existen reportes en donde se ha comprobado que la lactasa, comparada con otras enzimas de levaduras, mantiene una actividad razonable a valores de pH ácido de aproximadamente 3 a 4 (Pessela *et al.*, 2003).

Está reportado que el sodio es un inhibidor de la producción de lactasa (Jurado *et al.*, 2004), lo cual puede explicar la ausencia de esta enzima bajo estas condiciones, sin embargo la levadura fue capaz de producir la mitad de la biomasa que se produjo al emplear el amortiguador de fosfatos en el medio de cultivo.

Tabla 9 Variables del cultivo de *K. marxianus* CDBBL 278 en medio sólido con amortiguadores de pH

Condición	Biomasa producida (mg/gms)	$Y_{X/S}$	Lactosa (mg/gms)		Consumo lactosa (%)
			0 h	36 h	
Sin amortiguador	15±1.8 ^c	0.25±0.03 ^b	153.4±5 ^a	93.56±0.03 ^c	39±0.3 ^c
Amortiguador de fosfato de potasio	53±0.1 ^a	0.36±0.001 ^a	164±10 ^a	16.9±0.03 ^a	90±0.01 ^a
Amortiguador de acetato de sodio	24.3±1.1 ^b	0.24±0.03 ^b	148.4±7.3 ^a	49±0.03 ^b	67±0.001 ^b

Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.5$).

Estos resultados son consistentes con lo obtenido en la sección 6.1, encontrando valores similares de producción de biomasa, rendimiento y consumo de sustrato al emplear el nivel de inóculo de 2.5×10^6 cel/gms.

CONCLUSIONES

1. Las diferentes sales empleadas no amortiguan los cambios de pH entre el inicio y final del cultivo.
2. Las sales de fosfato aumentan el consumo de sustrato, disminuyen la fase de retardo y aumentan la velocidad de formación de CO₂ en el cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278.

Estos resultados sugieren que la regulación del pH puede jugar un papel importante en el mejoramiento del cultivo, por tal motivo se procedió a estudiar el efecto de la utilización de mezclas de sulfato de amonio (SA) y urea (U) sobre las fases de crecimiento, las tasas de actividad respiratoria, la producción de CO₂ y biomasa, el consumo de lactosa, así como los rendimientos de biomasa y de las actividades enzimáticas en el cultivo de 6 cepas de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido.

**6.2 EFECTO DE LA FUENTE DE
NITRÓGENO EN EL CMS DE *K. marxianus*
CEPAS UCDC 351, NCYC 587, 1109, 1429,
CDBBL 278 y AGUA MIEL A1**

6.2 EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL CMS DE *K. marxianus* CEPAS UCDC 351, NCYC 587, 1109, 1429, CDBBL 278 y AGUA MIEL A1

La utilización de mezclas de SA y U es una estrategia conocida para el control de pH en CMS (Raimbault y Alazard, 1980; Clementi y Rossi, 1986) así como también es conocido su efecto positivo sobre el crecimiento de levaduras (Boze *et al.*, 1989; Saucedo-Castañeda *et al.*, 1992). Por lo tanto, en esta sección se estudió el efecto de la fuente de nitrógeno en el control del pH del cultivo, en el estado fisiológico así como en la producción de biomasa, consumo de lactosa, rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y de actividades enzimáticas de seis levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido. Para este propósito se emplearon mezclas de SA:U (100:0; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80 y 0:100) en el medio de cultivo. La concentración inicial de lactosa así como el tiempo de cultivo para todas las condiciones estudiadas fueron de 169.4 ± 11.6 mg/gms y 32 h, respectivamente. La toma de muestras se realizó al inicio y final del cultivo. Los análisis se hicieron por triplicado y se trabajó con unidades experimentales independientes.

6.2.1 ANÁLISIS DE RESPIROMETRÍA

En las Figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13, se muestra la velocidad de formación de CO_2 de *K. marxianus* UCDC 351, NCYC 587, Agua Miel A1, NCYC 1109, 1429 y CDBBL 278, respectivamente, empleando diferentes mezclas de sulfato de amonio (SA) y urea (U) como fuente de nitrógeno. Se puede apreciar que la velocidad de formación de CO_2 del CMS de *Kluyveromyces marxianus* cepas UCDC 351, Agua Miel A1 y NCYC 587 (Fig. 8, 9 y 10), prácticamente no se ve afectada por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno. Mientras que para la cepa NCYC 1109 (Fig. 11), la fase de retardo se alarga aproximadamente 10 h en presencia de urea. Sin embargo, las cepas NCYC 1429 (Fig. 12) y CDBBL 278 (Fig. 13) se ven muy afectadas por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno. El perfil de CO_2 encontrado en este estudio para la cepa CDBBL 278 coincide con el reportado en la sección 6.1, en donde se presentan fases de retardo de aproximadamente 12 h.

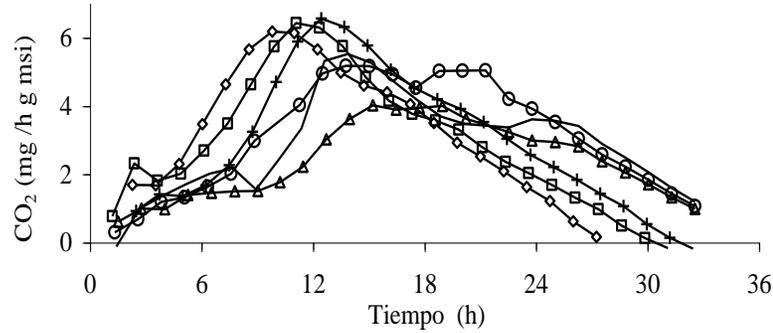


Figura 8 Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* UCDC 351, en CMS.

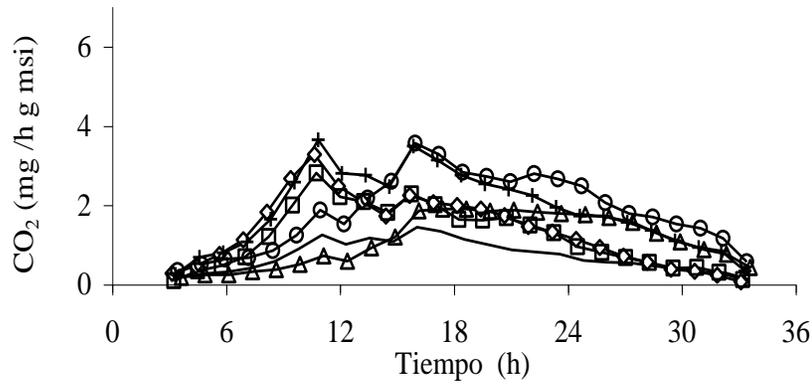


Figura 9 Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* Agua Miel A1, en CMS.

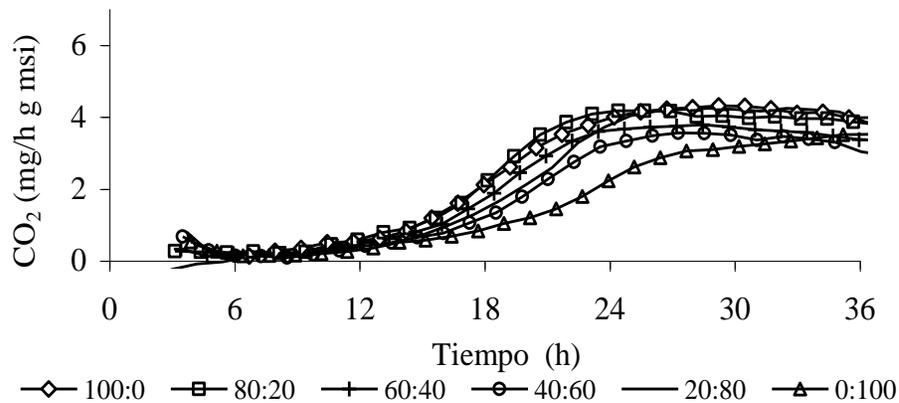


Figura 10 Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, en CMS.

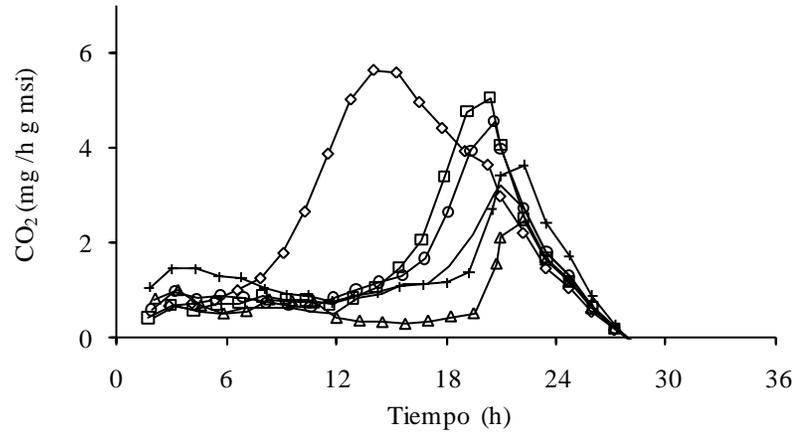


Figura 11 Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1109, en CMS.

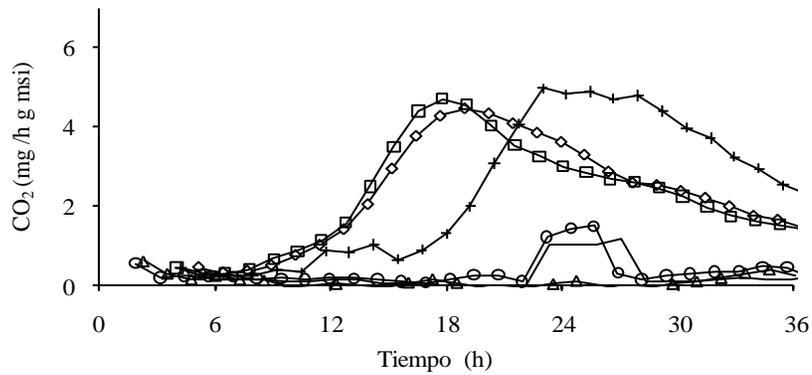


Figura 12 Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1429, en CMS.

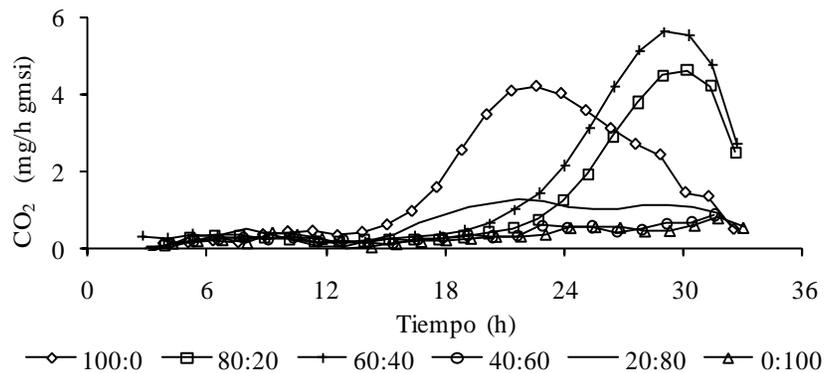


Figura 13 Efecto de la relación SA:U como fuente de nitrógeno en las fases de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278, en CMS.

En las Figuras 14, 15 y 16, se muestra el efecto de la relación SA:U sobre la fase de retardo, la tasa de actividad respiratoria y el CO₂ total formado, del CMS de todas las cepas de *K. marxianus* estudiadas.

La fase de retardo se vio afectada por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno. Pequeñas proporciones de esta extendieron la fase de retardo de los cultivos. La cepa UCDC 351 presentó las fases de retardo más cortas (2.9 a 3.7 h) sin diferencia significativa al emplear sólo SA o con una proporción de hasta el 40% de U en la fuente de nitrógeno. Mientras que para las cepas de Agua Miel A1 y NCYC 587 no hubo diferencia significativa en las fases de retardo independientemente de la condición estudiada. Sin embargo, las cepas NCYC 1109, 1429 y CDBBL 278 presentaron fases de retardo más largas al ir aumentando la proporción de U en el medio de cultivo (Fig. 14).

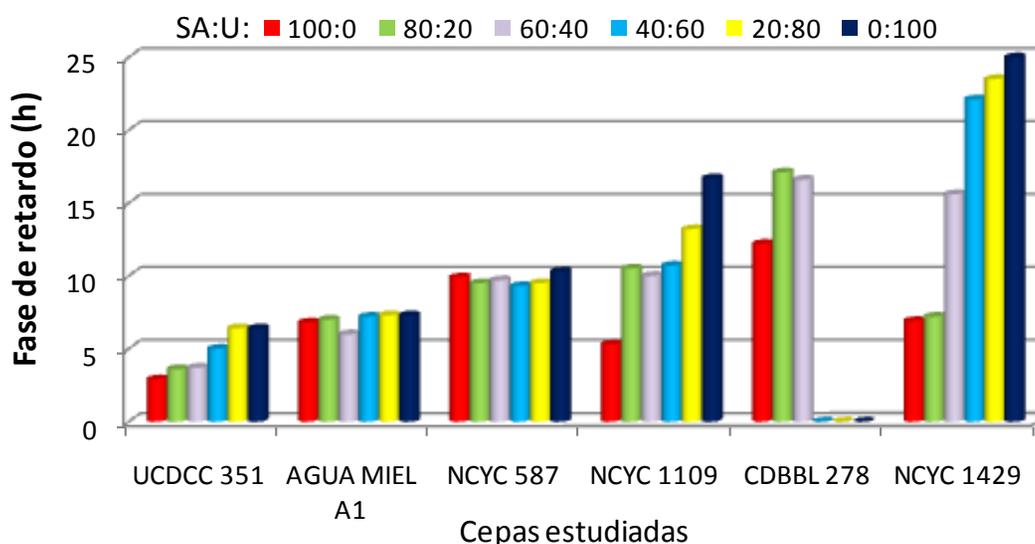


Figura 14 Efecto de la relación SA:U en las fases de retardo de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS.

La cepa Agua Miel A1 presentó la mayor tasa de actividad respiratoria (Fig. 15) de 0.42 h⁻¹ empleando sólo SA o con una proporción de U de hasta un 40 % en la fuente de nitrógeno en donde no hubo diferencia significativa entre estas proporciones. Para las cepas NCYC 587, 1109 y CDBBL 278 se presentaron las mejores tasas de actividad respiratoria cuando sólo

había SA en la fuente de nitrógeno (0.26 , 0.27 y 0.27 h^{-1} , respectivamente) y disminuyeron al aumentar la proporción de urea en el medio de cultivo. Mientras que para la cepa NCYC 1429 no hubo diferencia significativa al emplear sólo SA (0.21 h^{-1}) o con una proporción de urea del 20% en la fuente de nitrógeno (0.23 h^{-1}). En el caso de la cepa UCDC 351 la mejor tasa de actividad respiratoria (0.27 h^{-1}) se observó con una proporción de urea de 40 % en la fuente de nitrógeno.

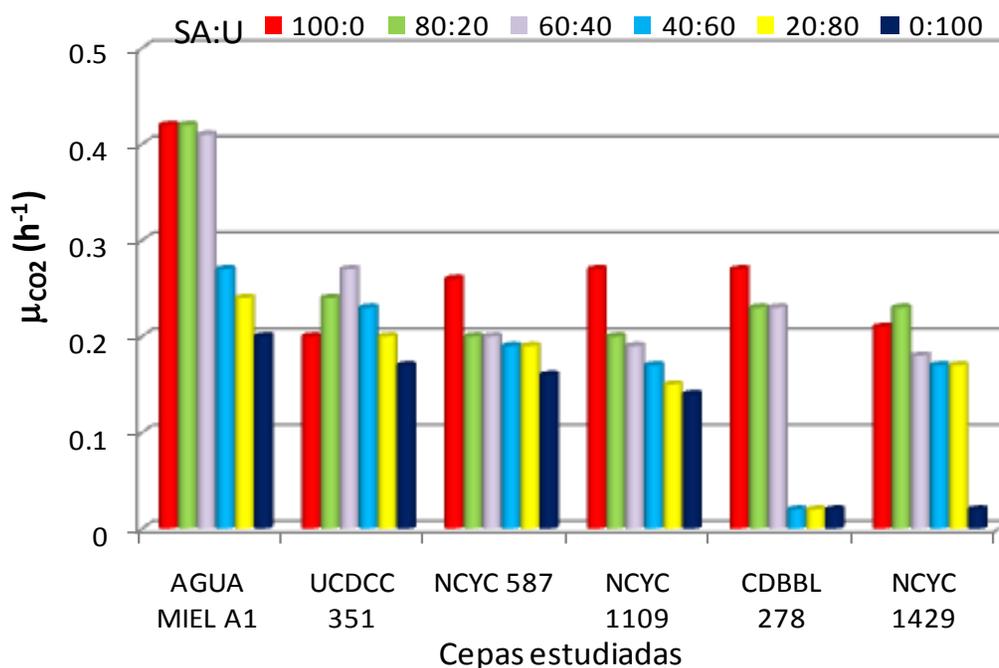


Figura 15 Efecto de la relación de SA:U en la tasa de actividad respiratoria de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS.

En la Figura 16 se muestra el efecto de la relación SA:U en el CO_2 total formado de las cepas en estudio. *K. marxianus* UCDC 351 presentó los mejores títulos de CO_2 total formado, independientemente de la proporción de SA:U presente en la fuente de nitrógeno (aproximadamente $96 \text{ mgCO}_2/\text{gmsi}$). Para las cepas NCYC 587 y 1429 y CDBBL 278 no hubo diferencia significativa al emplear sólo SA o una proporción de U de 20 a 40 % en la fuente de nitrógeno. La cepa NCYC 1109 presentó el mayor título de CO_2 total formado cuando sólo había SA en la fuente de nitrógeno ($65.4 \pm 0.6 \text{ mgCO}_2/\text{gmsi}$). Mientras que para la cepa Agua Miel A1 no hubo diferencia significativa en el CO_2 total formado al emplear 40 y 60 % de U en la fuente de nitrógeno (57.1 y $55.4 \text{ mgCO}_2/\text{gmsi}$, respectivamente).

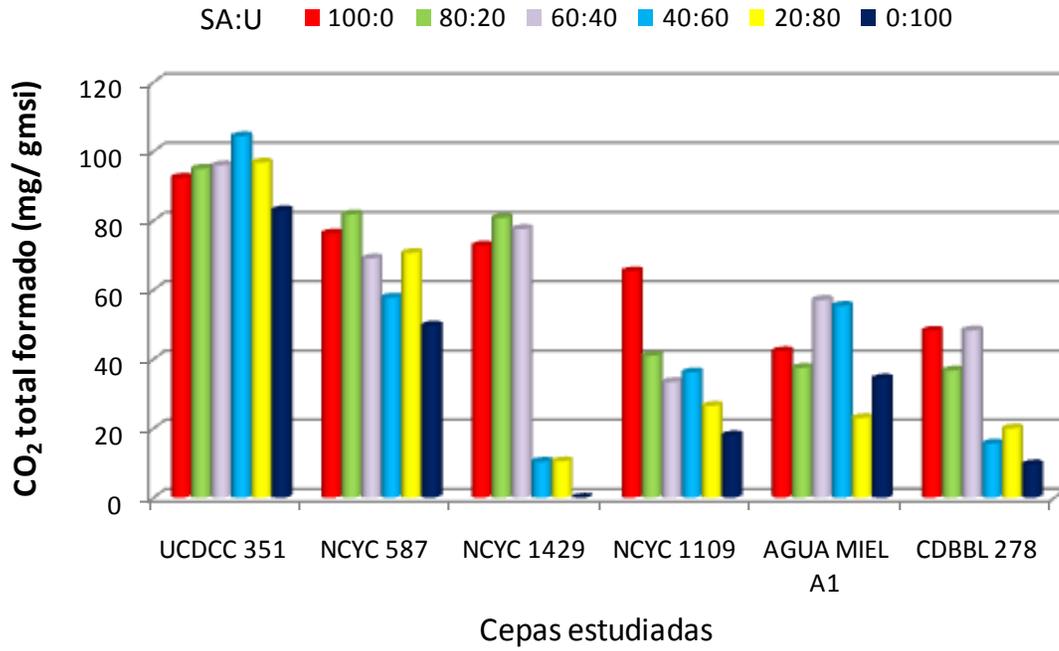


Figura 16 Efecto de la relación SA:U en el CO₂ total formado de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS.

6.2.2 CONTENIDO DE HUMEDAD, ACTIVIDAD DE AGUA, pH, PRODUCCIÓN DE BIOMASA, CONSUMO DE LACTOSA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA ($Y_{X/S}$)

El contenido de humedad, la actividad de agua (A_w) y el pH inicial para todas las cepas en estudio fueron de 74.7 ± 0.4 %, 0.997 ± 0.002 y 5.5 ± 0.2 , respectivamente. El contenido de humedad y la actividad de agua (A_w) final para todas las cepas fue de 71.2 ± 1.5 % y 0.994 ± 0.002 . En todos los casos, el pH al final del cultivo fue considerablemente ácido y varió de 2.7 ± 0.1 a 3.5 ± 0.6 , excepto en los casos donde se empleó únicamente urea en la fuente de nitrógeno (pH de 6.4 ± 0.3).

En las Figuras 17, 18 y 19, se presentan los parámetros importantes del cultivo: producción de biomasa, consumo de lactosa y rendimiento ($Y_{X/S}$) para las 6 cepas en estudio. Las cepas NCYC 587 y UCDCC 351 se vieron menos afectadas por la presencia de U en la fuente de nitrógeno, mientras que la mayor producción de biomasa se presentó con la cepa NCYC 1429 (78.4 mgX/gms) sólo con SA en la fuente de nitrógeno. Sin embargo, la cepa CDBBL 278 fue la más afectada por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno, con la menor producción de biomasa (Fig. 17).

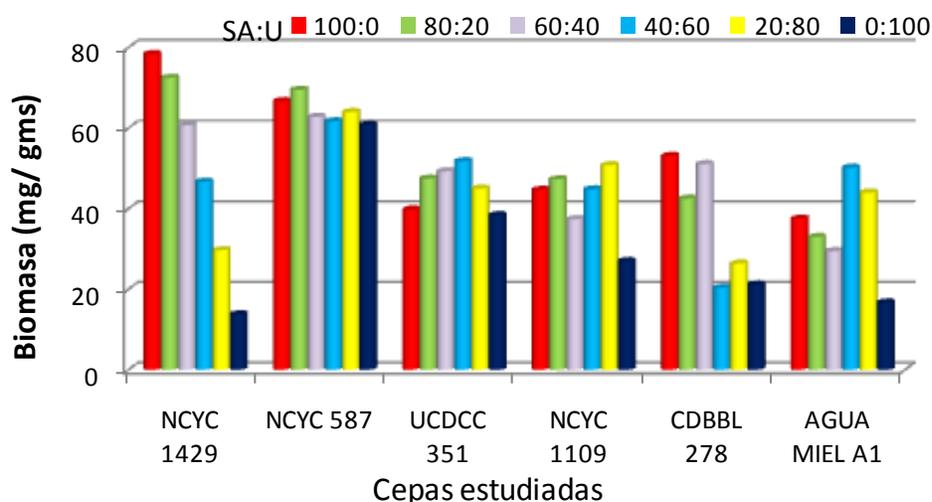


Figura 17 Efecto de la relación de SA:U en la producción de biomasa de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS.

En cuanto al consumo de lactosa (Fig. 18), se mantuvo arriba del 80 % para casi todas las condiciones del medio y cepas estudiadas. Para la UCDCC 351 el consumo de lactosa no se ve

afectado al emplear pequeñas proporciones de urea en la fuente de nitrógeno (< 60%). Para las cepas NCYC 1109 y Agua Miel A1, el consumo de lactosa no se ve afectado por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno hasta en una proporción del 80 %. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, específicamente al emplear proporciones de SA:U de 25:75 y 0:100 en el CMS de *Schwanniomyces castellii* (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1992), en donde observan un consumo de sustrato con la primera proporción de 85.2 % y con la segunda de 93.3 %. Sin embargo, el consumo de lactosa sí se ve afectado para las cepas 1429 y CDBBL 278 por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno hasta en una proporción mayor del 40%.

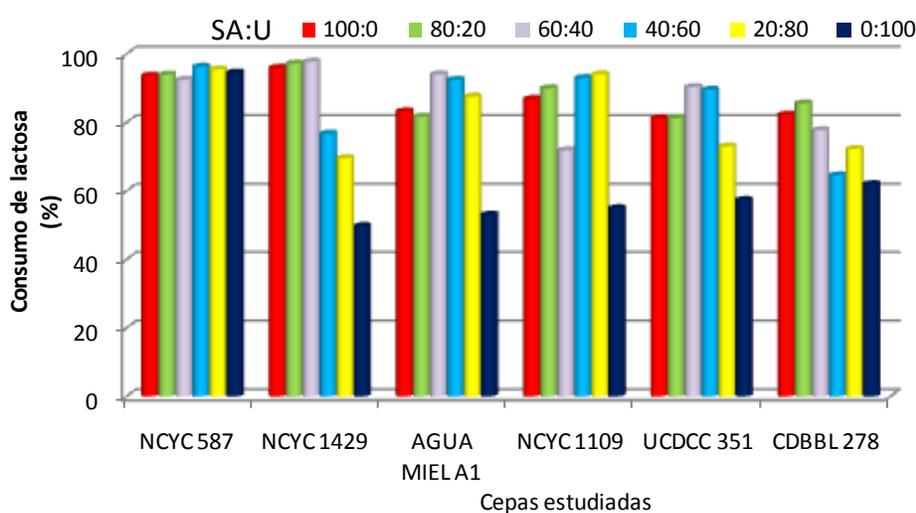


Figura 18 Efecto de la relación de SA:U en el consumo de lactosa de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS.

En la Figura 19 se presenta el efecto de la relación SA:U en el rendimiento de las seis cepas de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido. Para la cepa NCYC 1429, los mejores rendimientos se observaron cuando la fuente de nitrógeno fue suplementada sólo con SA y con 20% de urea ($Y_{X/S}=0.50$ y 0.45 , respectivamente). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura (Inchaurredo *et al.*, 1994; Marison y von Stockan, 1986) para la cepa de *K. fragilis* NRRLY 1109 ($Y_{X/S}=0.46$ y 0.51 , respectivamente) en CML empleando 8 y 45 g/L de lactosa, a 30 °C. En tanto que para la cepa NCYC 587, los mejores rendimientos ($Y_{X/S}=0.46$ y 0.48) se observaron cuando la fuente de nitrógeno fue suplementada sólo con SA y con 20% de urea, respectivamente. Para la cepa UCDC 351 se observa un rendimiento de biomasa promedio de 0.37 ± 0.04 al variar la composición de la fuente de nitrógeno. Estos rendimientos

coinciden con los reportados en la literatura (Lukondeh *et al.*, 2005) en CML empleando 40 g/L de lactosa en el medio de cultivo ($Y_{X/S}=0.37$) para *K. marxianus* FII 510700. Para la cepa NCYC 1109 el rendimiento de biomasa se ve poco afectado por la presencia de urea en la fuente de nitrógeno. Por último, la cepa CDBBL 278 presentó el mejor rendimiento ($Y_{X/S}=0.37$) cuando menos del 40% de la fuente de nitrógeno fue suplementado con urea, mientras que el mejor rendimiento para la cepa Agua Miel A1 ($Y_{X/S}=0.31$) se observó cuando la fuente de nitrógeno fue suplementada con 60% de urea (Fig. 19).

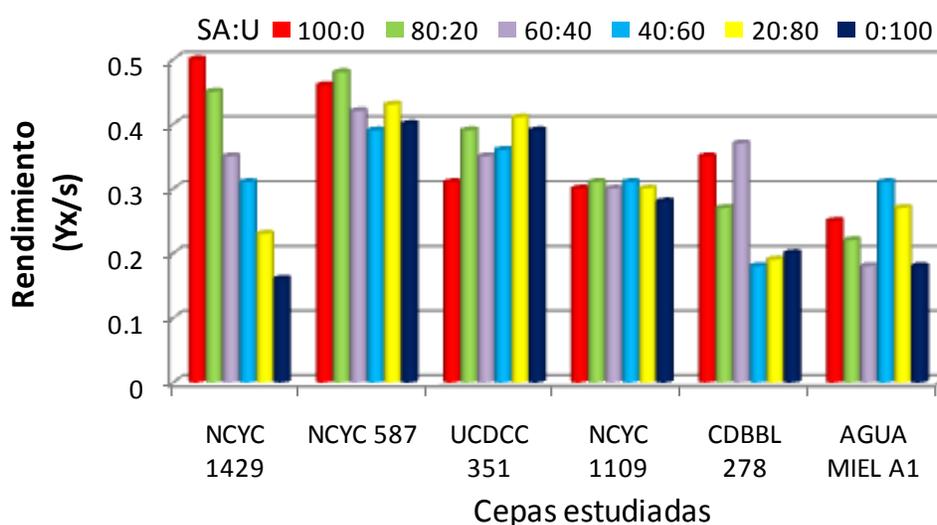


Figura 19 Efecto de la relación de SA:U en el rendimiento de biomasa de levaduras de *Kluyveromyces marxianus* en CMS.

6.2.3 PRODUCCIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (LACTASA E INULINASA)

En la Figura 20 se presenta el efecto de la utilización de mezclas de SA:U en el cultivo de las cepas estudiadas: UCDCC 351, NCYC 587, 1109, 1429, CDBBL 278 y Agua Miel A1, en el rendimiento de actividad lactasa. No se encontraron diferencias significativas en los rendimientos de actividad lactasa para la cepa NCYC 587 cuando la fuente de nitrógeno fue suplementada sólo con SA (2129.3 ± 115 UI/gX) o con una proporción de U del % (2038.3 ± 47 UI/gX). Mientras que para las demás cepas los mayores rendimientos se presentaron con 20% de U en la fuente de nitrógeno. No se detectó actividad en las proporciones de U del 60, 80 y 100% en la fuente de nitrógeno.

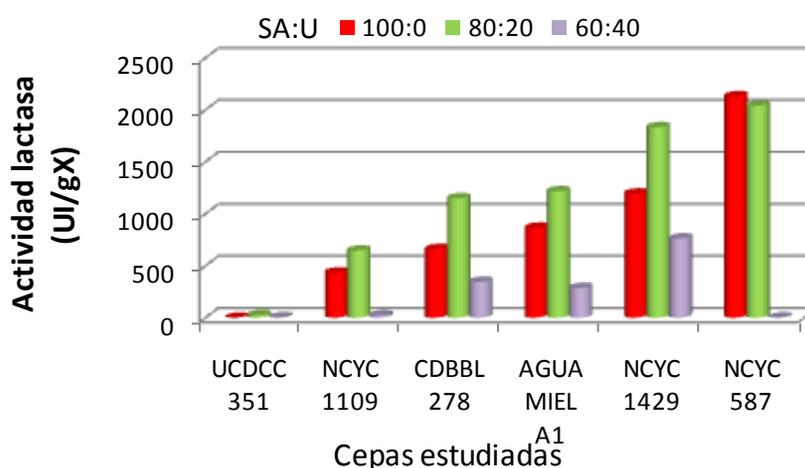


Figura 20 Efecto de la relación de SA:U en el rendimiento de actividad lactasa de levaduras de *K. marxianus* en CMS.

En la Figura 21 se presenta el efecto de la utilización de mezclas de SA:U en el cultivo de las cepas estudiadas: UCDCC 351, NCYC 587, 1109, 1429, CDBBL 278 y Agua Miel A1, en el rendimiento de actividad inulinasa. La cepa CDBBL 278 presentó los mayores rendimientos de actividad inulinasa (241.7 UI/gX), cuando la fuente de nitrógeno fue suplementada con 20% de U en la fuente de nitrógeno. El rendimiento de actividad enzimática inulinasa representa el 72% del valor reportado en CML para ésta cepa, sin embargo, estos resultados son cercanos a los valores reportados en la literatura (Selvakumar y Pandey, 1999, Mazutti *et al.*, 2006, Mazutti *et al.*, 2007) para éste género. No se encontró actividad inulinasa en las proporciones de U del 60, 80 y 100% en la fuente de nitrógeno.

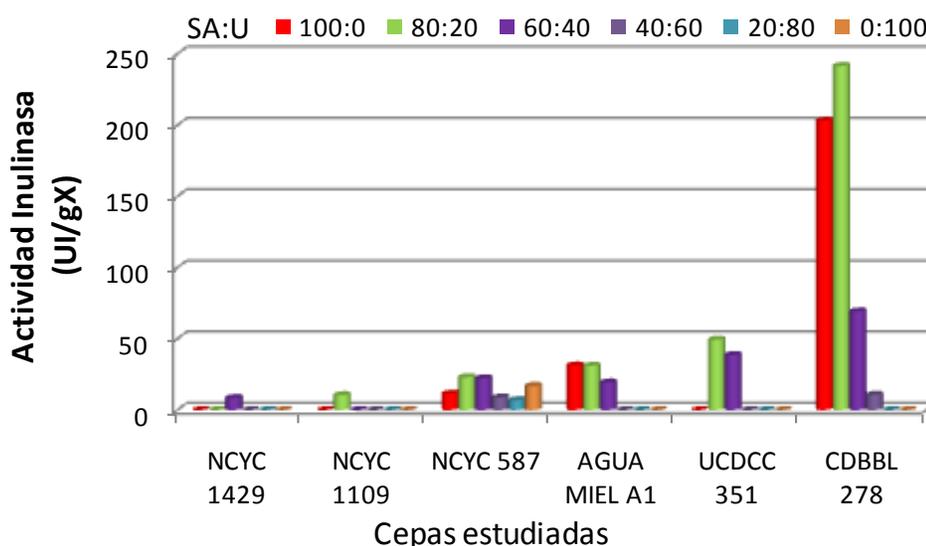


Figura 21 Efecto de la relación de SA:U en el rendimiento de actividad inulinasa del CMS de levaduras de *K. marxianus*.

En la Tabla 10 se presenta la comparación de los resultados de las variables del cultivo de las 6 cepas estudiadas con una proporción de urea del 20 % en la fuente de nitrógeno. Las cepas UCDC 351, NCYC 587 y 1429 se adaptan mejor al medio de cultivo y se ve reflejado en las fases de retardo, en el CO₂ total formado y en los rendimientos de biomasa y de actividad lactasa para las dos últimas cepas.

Tabla 10 Comparación de los resultados de las variables del CMS de *K. marxianus* de las 6 cepas en estudio, con una proporción de urea del 20 % en la fuente de nitrógeno.

Cepa	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado mg/g msi)
UCDC 351	3.6±0.1	0.24±.001	0.99	95±5.8
NCYC 587	9.5±0.1	0.2±0.02	0.99	81.8±1.3
NCYC 1109	10.5±0.1	0.2±0.001	0.98	41±2.5
NCYC 1429	7.2±1.9	0.23±0.03	0.99	80.8±7.8
CDBBL 278	17.1±1	0.23±.001	0.99	36.7±0.9
AGUA MIEL A1	6.4±0.9	0.42±0.01	0.94	37.5±0.5

Cepa	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
UCDC 351	47.5±0.4	81.3±1.4	0.39±0.01	24.4±0.02	nd	49.4±1
NCYC 587	69.5±0.5	94±0.1	0.48±0.02	2038.3±47	15.4±0.001	23.0±0.1
NCYC 1109	47.4±0.1	90±0.2	0.31±0.003	644.9±7	nd	10.5±0.1
NCYC 1429	72.5±1.2	97.2±0.04	0.45±0.05	1831.1±15.2	9.7±0.04	Nd
CDBBL 278	42.5±1.2	85.6±0.02	0.27±0.001	1147.7±17	34.2±0.2	241.6±0.4
AGUA MIEL A1	33±0.3	81.7±0.03	0.22±0.002	1214.7±15.2	nd	31.1±0.05

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

En la Tabla 11 se presentan algunas comparaciones de actividades enzimáticas tanto de lactasa como de inulinasa en CMS y en CML con respecto a lo encontrado en este trabajo. Es importante mencionar que el rendimiento de actividad lactasa obtenida en este trabajo con las cepas NCYC 587, 1429 y CDBBL 278 se encuentra dentro de los valores reportados en CML (Hewitt y GrootWassink, 1984; Espinoza *et al.*, 1992; Barberis y Gentina, 1998) para esta especie, mientras que en el caso de las actividades más altas reportadas (Barberis y Segovia, 2002; Cortés *et al.*, 2005; Becerra *et al.*, 2004) se trabajó con algunas cepas modificadas genéticamente. El rendimiento de actividad inulinasa extracelular obtenida con la cepa CDBBL 278 se encuentra dentro de los valores reportados tanto en CML (Hewitt y GrootWassink, 1984; Espinoza *et al.*, 1992) así como en CMS (Selvakumar y Pandey, 1999; Mazutti *et al.*, 2006), empleando inulina como inductor.

En el anexo A-4 (Tablas 20-25) se presenta cada una de las cepas y sus variables de cultivo en donde se muestra el análisis estadístico de las mismas.

Tabla 11 Comparación de rendimientos de actividades enzimáticas reportadas en la literatura en CML y CMS respecto a las obtenidas en este trabajo.

Referencias en CML y CMS	CML O CMS	Actividad	Actividad Inulinasa
		lactasa (UI/g X)	Extracelular UI/gX
Espinoza <i>et al.</i> , 1992	CML	1590 ⁵	
Barberis y Gentina, 1998	CML	699 ¹	
Barberis y Segovia, 2002	CML	5910	
Cortés <i>et al.</i> , 2005	CML	2800	
Becerra <i>et al.</i> , 2004	CML	5030	
Hewitt y GrootWassink, 1984	CML	310	
Espinoza <i>et al.</i> , 1992	CML + INDUCTOR		812
Selvakumar y Pandey, 1999	CMS		122.9
Mazutti <i>et al.</i> , 2006	CMS		391
Hewitt y GrootWassink, 1984	CML + INDUCTOR		400

Cepas de *Kluyveromyces marxianus* evaluadas en este trabajo

UCDCC 351	CMS	24.4*	Nd
NCYC 587	CMS	2038.3*	23*
NCYC 1109	CMS	644.9*	10.5*
NCYC 1429	CMS	1831.1*	8.5 [^]
CDBBL 278	CMS	1147.7*	241.6*
AGUA MIEL	CMS	118.9*	31.3

1=UCDCC 351; 5=CDBBL 278; * 20% de urea adicionada en el medio de cultivo, [^] 40% de urea adicionada en el medio de cultivo, nd = no detectada.

CONCLUSIONES

1. La adición de mezclas de sulfato de amonio y urea no logró regular el cambio del pH en los cultivos, sin embargo, pequeñas concentraciones de urea (20 y 40%) favorecieron la producción de la actividad enzimática tanto de lactasa como de inulinasa para todas las cepas estudiadas.
2. Los rendimientos $Y_{x/s}$ obtenidos (0.37-0.5) coinciden con lo reportado en la literatura (Marison y von Stockan, 1986; Inchaurredo, 1994), en CML.
3. Los rendimientos de actividad lactasa obtenidos fueron bajos con respecto a lo reportado en CML: 5910 (Barberis y Gentina, 1998), 5770 (Barberis y Segovia, 2002) y 2800 UI/gX (Cortés *et al.*, 2005) por *Kluyveromyces fragilis* NRLL-Y1109; sin embargo, es difícil esta comparación ya que algunos estudios se han llevado a cabo con cepas modificadas genéticamente y en CML.

Kluyveromyces marxianus cepa NCYC 587 presentó los mayores rendimientos de actividad lactasa cuando la fuente de nitrógeno fue suplementada sólo con SA (2129.3 UI/gX) y con 20% de urea en la fuente de nitrógeno (2038.3 UI/gX). Mientras que la cepa CDBBL 278 presentó los mejores rendimientos de actividad inulinasa (241.6 UI/gX) con 20% de urea en la fuente de nitrógeno a las 32 h de cultivo. Por lo anterior, fueron seleccionadas para estudiar efecto del aumento en la concentración de lactosa así como de todos los nutrientes del medio en el CMS de *K. marxianus*.

**6.3 EFECTO DEL AUMENTO EN LA
CONCENTRACIÓN DE LACTOSA Y LA
CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES EN
EL MEDIO DE CULTIVO DE *Kluyveromyces marxianus*
CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278 EN MEDIO SÓLIDO**

6.3 EFECTO DEL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA Y LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO DE *Kluyveromyces marxianus* CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278 EN MEDIO SÓLIDO

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del aumento de la fuente carbono y de todos los nutrientes en el medio de cultivo sobre las fases de crecimiento y la producción de biomasa del CMS de *Kluyveromyces marxianus*. En un primera etapa se llevaron a cabo CMS aumentando la concentración de la fuente de carbono en 50, 100 y 150 g/L, ya que el límite de solubilidad de la lactosa es de 170 g/L. En una segunda etapa, se llevaron a cabo CMS con estas cepas aumentando en la concentración de todos los nutrientes del medio de cultivo en 1X, 2X y 3X.

El tiempo de cultivo fue de 36, 48 y 61 h con 50, 100 y 150 g/L de lactosa para ambas cepas. A partir de este capítulo la fuente de nitrógeno fue suplementada con una proporción de 20 % de urea en la fuente de nitrógeno. En todos los casos se tomaron muestras sólo al inicio y final del cultivo.

6.3.1 EFECTO DEL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA EN EL CMS DE *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278

Los contenidos de humedad inicial del cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 fueron de 72.2 ± 4 y 69.9 ± 2.2 %, respectivamente y final de 69.9 ± 4.7 y 67.8 ± 0.5 %, respectivamente. La A_w inicial en ambos casos fue de 0.993 ± 0.006 y 0.991 ± 0.002 , respectivamente. Mientras que el pH inicial fue de 5.7 ± 0.1 y 6.1 ± 0.2 y el pH final de 2.7 ± 0.2 para ambas cepas. Esto se puede deber a la producción de compuestos ácidos en el cultivo (Mahoney, 1998).

En la Figura 6.9 se presentan las velocidades de formación de CO_2 del CMS de *K. marxianus* cepas NCYC 587 y CDBBL 278, aumentando la concentración de lactosa en el medio de cultivo (50, 100 y 150 g/L). La cepa NCYC 587 no se ve afectada por el aumento en la concentración de lactosa como se observa en la Fig. 22, presentándose fases de retardo de aproximadamente 6 h. Mientras que para la cepa CDBBL 278 se observa que al aumentar la

concentración de lactosa en el medio de cultivo la fase de retardo es mayor (13 h). El tiempo final del cultivo con la concentración de lactosa de 100 y 150 g/L fue de 12 y 31 h más con respecto a la concentración de 50 g/L de lactosa en el medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ghaly y Ben-Hassan en 1995, en donde estudiaron intervalos de concentración de lactosa de 50, 75, 100 hasta 200 g/L en CML y observaron que al aumentar la concentración de lactosa se incrementó también la fase de adaptación (tiempo requerido para que la levadura se adapte al nuevo medio) y disminuyó la velocidad específica de crecimiento ($\mu=0.14 \text{ h}^{-1}$) para ésta especie en CML. Resultados similares fueron reportados por Margaritis y Bajpai en 1983. Sin embargo, la cepa NCYC 587 no sigue esta tendencia y sus fases de crecimiento no se ven afectadas por la presencia de altas concentraciones de lactosa en el medio de cultivo.

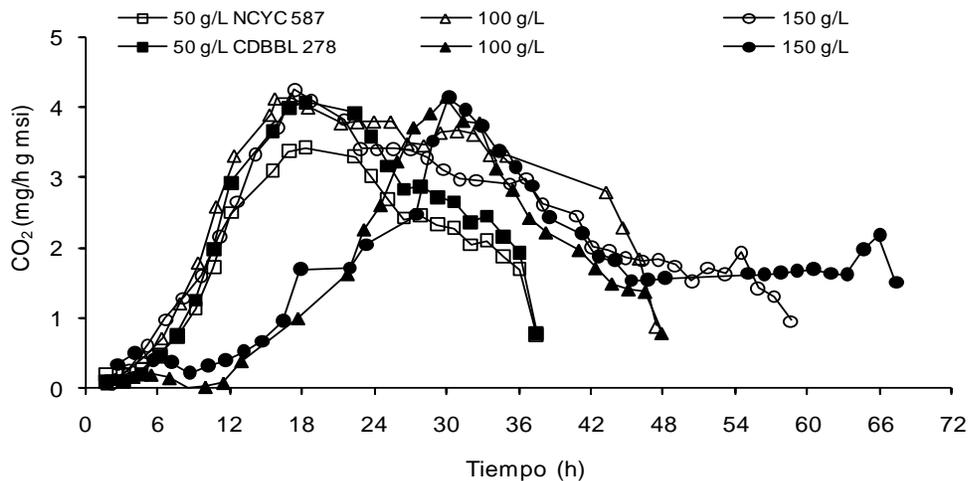


Figura 22 Efecto de la concentración de lactosa en la velocidad de formación de CO₂ de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.

En la Tabla 12 se muestra el efecto del aumento en la concentración de lactosa sobre las fases de retardo, tasas de actividad respiratoria, CO₂ total formado biomasa, consumo de lactosa y rendimientos del CMS de *K. marxianus* cepas NCYC 587 y CDBBL 278. Se observa que para la cepa NCYC 587 no hay diferencia significativa en las fases de retardo ni en las tasas de actividad respiratoria al emplear 50, 100 ó 150 g/L de lactosa en el medio de cultivo. De igual manera, no se observa diferencia significativa en el CO₂ total formado al emplear 100 y

150 g/L de lactosa en el medio de cultivo. La tasa de actividad respiratoria obtenida con ambas cepas (0.33 y 0.36 h⁻¹), coincide con la tasa específica de crecimiento (0.37 h⁻¹) reportada en la literatura (Tredwell *et al.*, 2005) para *K. marxianus* FII 510700 empleando 40 g/L de lactosa en CML.

Para *K. marxianus* CDBBL 278 la menor fase de retardo (7.6 h) se obtuvo cuando el medio de cultivo fue suplementado con 50 g/L de lactosa. La mayor producción de biomasa para ambas cepas se obtuvo con una concentración de lactosa de 150 g/L, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Ghaly y Ben-Hassan, 1995; Margaritis y Bajpai, 1983), en donde con 150 g/L de lactosa se observa una producción de biomasa de 4.2 g/L.

Por otra parte, con una concentración inicial de lactosa de 50 g/L, las dos cepas fueron capaces de consumir aproximadamente el 90 % del sustrato, obteniendo el mejor rendimiento (0.36±0.004), el cual coincide con el reportado en la literatura (Y_{x/s}=0.37) por Tredwell y col. en 2005 para *K. marxianus* FII 510700 empleando 40 g/L de lactosa en CML.

Los resultados obtenidos de las variables importantes del cultivo (fase de retardo, tasa de actividad respiratoria, producción de biomasa así como el consumo de lactosa y rendimiento de biomasa) de la cepa CDBBL 278 con 50 g/l de lactosa en el medio de cultivo, son similares a los reportados en la sección 6.1.1 y 6.1.2. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos en la sección 6.2, sólo el consumo de lactosa y la producción de CO₂ son similares entre sí. Mientras que para la cepa NCYC 587 sólo son similares los valores de producción de biomasa y de consumo de lactosa. Estas diferencias pueden deberse a que a partir de esta sección se trabajó con un tamaño de partícula de PUF menor (0.5-0.8 mm) a la que se había estado trabajando en las secciones anteriores (0.8 mm).

Tabla 12 Efecto del aumento en la concentración de lactosa sobre las fases de crecimiento del CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278.

Cepa	Lactosa (g/L)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h^{-1})	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)
NCYC 587	50	6.1±0.3 ^a	0.33±0.01 ^a	0.99	75±1.2 ^b	46.6±0.1 ^c	90.6±0.8 ^a	0.36±0.004 ^a
	100	6.4±0.1 ^a	0.34±0.01 ^a	0.99	137±8.8 ^a	56.9±0.2 ^b	80.1±0.004 ^b	0.23±0.003 ^b
	150	7.4±1.1 ^a	0.34±0.01 ^a	0.99	125±19 ^a	71.7±5.1 ^a	69.03±3.3 ^c	0.20±0.025 ^b
CDBBL 278	50	7.6±0.1 ^a	0.36±0.001 ^a	0.99	87.4±1.3 ^b	56.2±1.6 ^c	91.4±0.3 ^a	0.36±0.01 ^a
	100	13.8±1.1 ^b	0.20±0.01 ^b	0.99	69±12 ^c	67.6±0.4 ^b	72.8±1.1 ^c	0.32±0.007 ^b
	150	13.9±1 ^b	0.17±0.02 ^c	0.99	101.4±3 ^a	95.8±1.2 ^a	76.9±0.4 ^b	0.31±0.001 ^b

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) por cepa.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 fueron capaces de crecer en concentraciones elevadas de lactosa en CMS.
2. Al emplear 50 g/L de lactosa en el medio de cultivo se obtienen las fases de retardo más cortas (aproximadamente 6 h), las mayores tasas de actividad respiratoria (0.36 h⁻¹), el mejor consumo de sustrato (90 %) y los mejores rendimientos (0.36), en comparación con concentraciones de lactosa de 100 y 150 g/L en el medio de cultivo.
3. La máxima producción de biomasa para la cepa NCYC 587 y CDBBL 278 (71.7±5.1 y 95.8±1.2 mg/gms, respectivamente) se obtiene con la mayor concentración de lactosa presente en el medio de cultivo.
4. Se confirma que la levadura es capaz de usar una concentración de 150 g/L de lactosa, que es un valor cercano al límite de solubilidad de este azúcar en agua (170 g/L).

6.3.2 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN LAS VARIABLES PRINCIPALES DEL CMS DE *K. marxianus* CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278

En esta sección se presentan los resultados por variable. El tiempo de cultivo fue de 28 h para ambas cepas, excepto en el caso del cultivo de la cepa CDBBL 278 con el medio de cultivo 3X, el cual fue de 36 h. La toma de muestra se realizó cada 6 h de cultivo. Todos los análisis se hicieron por triplicado y se trabajó con unidades experimentales independientes.

6.3.2.1 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN LA VELOCIDAD DE FORMACIÓN DE CO₂ Y EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DEL CMS DE *K. marxianus* CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278

En la Figura 23 se presentan las velocidades de formación de CO₂ del CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 aumentando la concentración de nutrientes en el medio. Aquí se puede apreciar que al aumentar la concentración de nutrientes en 2X y 3X las fases de retardo para ambas cepas aumentan, mientras que la velocidad de formación de CO₂ disminuye. Al igual que el resultado obtenido en la sección 6.3.1, se observa que la cepa CDBBL 278 se ve más afectada por la presencia de altas concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo.

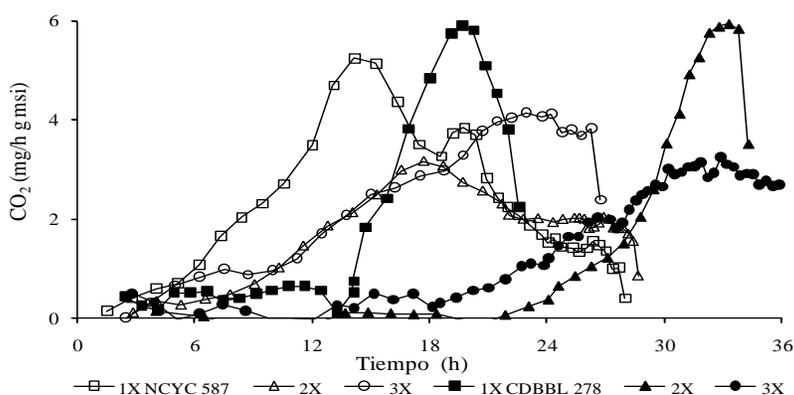


Figura 23 Efecto del aumento en la concentración de todos nutrientes en la velocidad de formación de CO₂ de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.

En la figura 24 se muestra el efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes del medio sobre la producción de biomasa del CMS de *K. marxianus* cepa NCYC 587 y CDBBL 278. Para la cepa NCYC 587 se observa que la producción de biomasa no se ve afectada por el aumento en la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. Sin embargo, para la cepa NCYC 587 la mayor producción de biomasa se obtuvo con los medios de cultivo 2X y 3X.

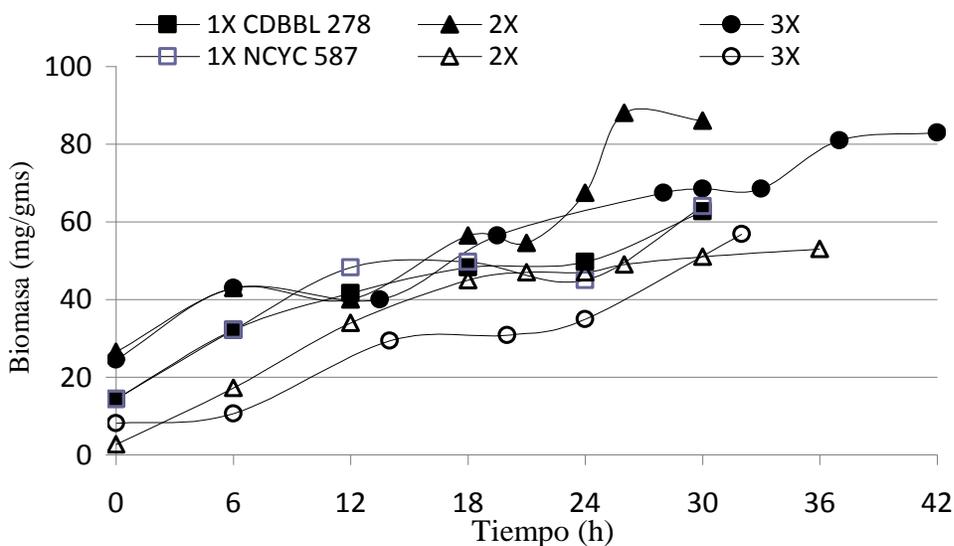


Figura 24 Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes en la producción de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.

6.3.2.2 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN EL CONSUMO DE LACTOSA Y RENDIMIENTO DE BIOMASA DEL CMS DE *K. marxianus* CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278

En la Figura 25 se muestra el efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes del medio sobre el consumo de lactosa del CMS de *K. marxianus* cepa NCYC 587 y CDBBL 278. Se observa que después de las 6 h de cultivo de *K. marxianus* NCYC 587, el consumo de lactosa aumentó para los medios de cultivo 1X y 2X, alcanzando el máximo consumo a las 30 h (71.2 y 79.4 %, respectivamente), lo cual concordó con la máxima producción de biomasa para la cepa NCYC 587, mientras que para el medio de cultivo 3X el mayor consumo de lactosa se observó a las 32 h de cultivo (73 %). De igual forma que con la cepa NCYC 587, la cepa CDBBL 278 presentó el mayor consumo de lactosa al final del cultivo para todos los casos estudiados.

El consumo de lactosa para las cepas NCYC 587 y CDBBL 278 fue menor en comparación con lo encontrado anteriormente empleando sólo SA como fuente de nitrógeno (93.7 y 83 %, respectivamente). Esta diferencia en el consumo de lactosa puede deberse a que el tiempo de cultivo en este estudio fue de 6 h menos en comparación con lo reportado en las secciones anteriores y a que las levaduras fueron más afectadas por la presión osmótica, debido al incremento en la concentración de todos los nutrientes del medio de cultivo.

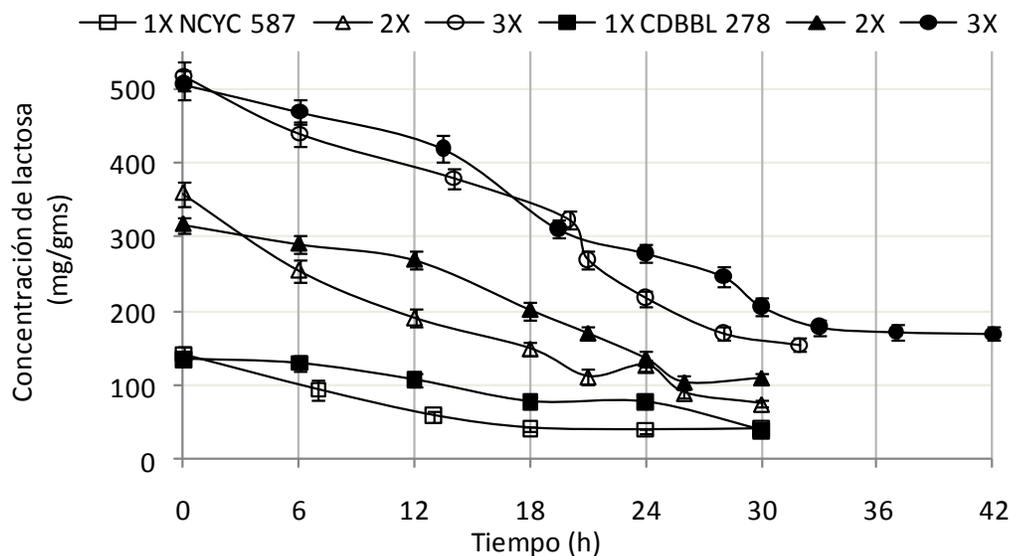


Figura 25 Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes en el consumo de lactosa de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.

De igual manera, para ambas cepas, el mejor rendimiento ($Y_{x/s}=0.4$) se obtuvo con el medio de cultivo 1X y al ir aumentando la concentración de nutrientes en el medio disminuyó el rendimiento de biomasa (Tabla 12).

6.3.2.3 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN EL pH, HUMEDAD Y Aw DEL CMS DE *K. marxianus* CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278

En la Figura 26 se presenta el efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes del medio en el pH del cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278. Para la cepa NCYC 587, el pH inicial fue de 5.93 ± 0.03 y después de las 6 h bajó considerablemente hasta llegar a un pH final de 2.84 ± 0.13 con los 3 medios de cultivo. En el caso de la cepa CDBBL 278, el pH inicial fue de 6.1 ± 0.01 y después de las 6 h bajó considerablemente con el medio de cultivo 1X, mientras que con el medio de cultivo 2X se mantuvo constante hasta las 24 h y con el medio 3X hasta las 40 h hasta llegar a un pH final de 3.03 ± 0.03 . Esta disminución en el pH del cultivo se puede deber a que se están liberando compuestos ácidos en el cultivo (Mahoney, 1998), sin embargo, no podemos precisar cuáles son ya que no se realizó un estudio para esto.

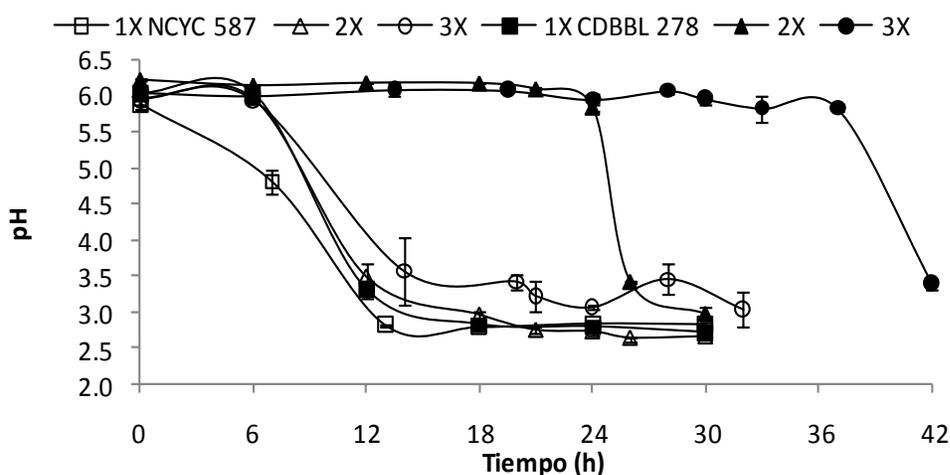


Figura 26 Evaluación del pH del cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 en medio sólido aumentando la concentraciones de todos los nutrientes del medio.

En la Figura 27 se presenta el efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes del medio sobre la humedad y la Aw del cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278. Se observa que para ambas cepas el contenido de humedad disminuye aproximadamente en un 10 % con respecto al inicial. Así mismo, se observa que la Aw se mantiene constante con el medio de cultivo 1X para ambas cepas. Sin embargo, al aumentar la concentración de nutrientes en el medio la Aw disminuye después de las 12 h de cultivo, tanto para *K.*

marxianus NCYC 587 como para la CDBBL 278. Esta tendencia se explica por el aumento en los sólidos presentes en el medio de cultivo.

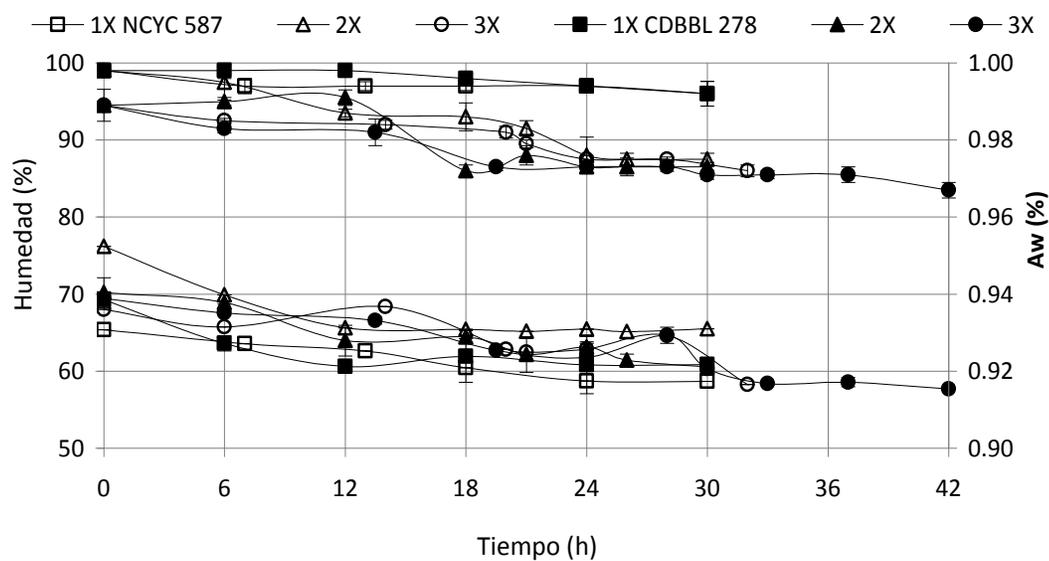


Figura 27 Evaluación del contenido de humedad y Aw del cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 en medio sólido aumentando la concentración de todos los nutrientes del medio.

6.2.3.4 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES DEL MEDIO (1X, 2X Y 3X) EN LOS RENDIMIENTOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE *K. marxianus* CEPAS NCYC 587 Y CDBBL 278 EN CMS

Los resultados del efecto de la concentración de todos los nutrientes en el medio sobre los rendimientos de actividad lactasa del CMS de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 se presentan en las Figuras 28 y 29, respectivamente. Los mayores rendimientos de actividad lactasa para la cepa NCYC 587 (Fig. 28) se obtuvieron a las 12 (331 UI/gX), 18 (188.1 UI/gX) y 20 h (157.7 UI/gX) de cultivo con los medios de cultivo 1X, 2X y 3X, respectivamente, lo cual concordó con los tiempos en que la levadura se encontraba en su fase de crecimiento acelerado, ya que esta enzima está asociada al crecimiento, de acuerdo a lo reportado por Inchaurredo y col. en 1994. Los rendimientos de actividad lactasa con el medio de cultivo 1X representan aproximadamente el 15 % del rendimiento de actividad reportado en la sección 6.2 (Tabla 10) para esta cepa.

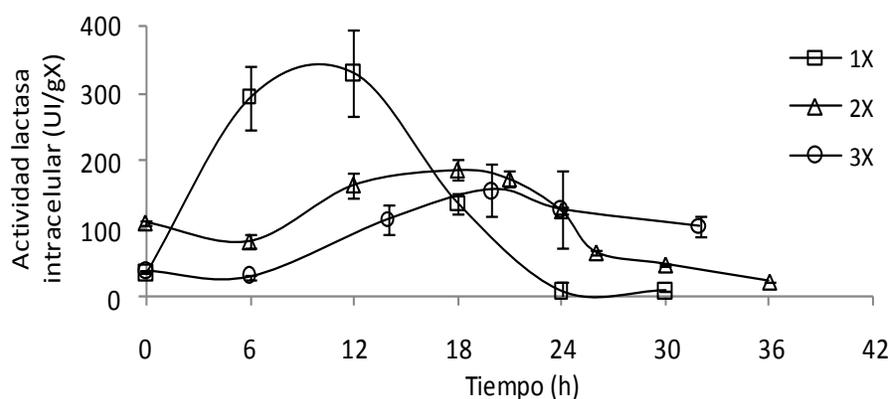


Figura 28 Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes del medio en los títulos de actividad lactasa de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 en CMS.

Para la cepa CDBBL 278 (Fig. 29) el mejor rendimiento de actividad lactasa (772 UI/gX) se obtuvo también con el medio de cultivo 1X, lo cual concordó con los tiempos en que la levadura se encontraba en su fase de crecimiento acelerado. Este valor representa el 67 % del rendimiento reportado en la sección 6.2 y el 48 % de lo reportado en la literatura (1590 UI/gX) para esta cepa en CML, respectivamente (Espinoza *et al.*, 1992). Es importante mencionar que los extractos enzimáticos se obtuvieron 2 días después de haber terminado el cultivo, lo cual

pudo haber ocasionado pérdida de la actividad enzimática y por eso los resultados obtenidos en este estudio son bajos en comparación con los obtenidos en la sección 6.2.

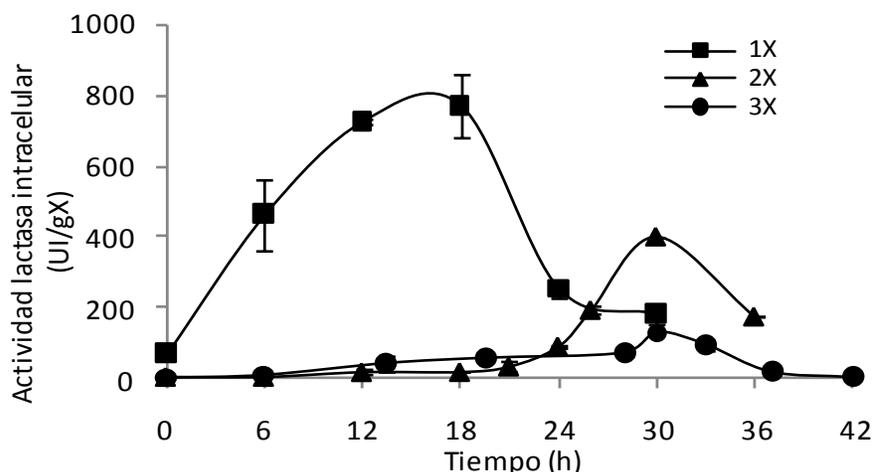


Figura 29 Efecto de la concentración de todos los nutrientes en los títulos de actividad lactasa de *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 en CMS.

Por otra parte, en la Figura 30 se presenta el efecto de la concentración de todos los nutrientes en el medio sobre los rendimientos de actividad inulinasa del CMS de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587. El mayor rendimiento de actividad inulinasa extracelular para la cepa NCYC 587 se obtuvo con el medio de cultivo 3X a las 28 h de cultivo (1064.1 UI/gX), lo cual concordó con los tiempos en que la levadura se encontraba en su fase de desaceleración y muerte, ya que esta enzima es excretada al medio de cultivo en esta fase de crecimiento (Rouwenhorst *et al.*, 1988; Barranco-Florido *et al.*, 2001). Este valor es mayor a los obtenidos en la sección 6.2 para esta cepa, esto probablemente se deba a que en este caso el tiempo de cultivo fue menor (32 h) y probablemente la enzima aún no perdía actividad. También es mayor a lo reportado en la literatura para esta especie en CMS (Tabla 11).

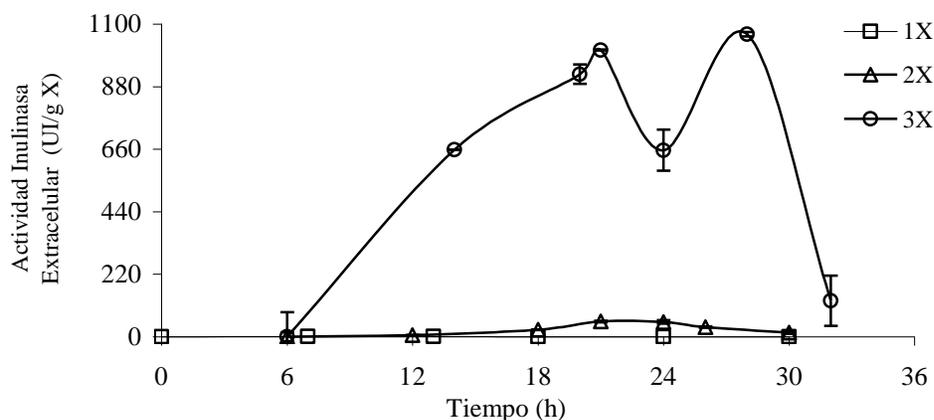


Figura 30 Efecto de la concentración de nutrientes en los títulos de actividad inulinasa extracelular de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 en CMS.

Por el contrario, para la cepa CDBBL 278 el mejor rendimiento de actividad inulinasa se obtuvo con el medio 1X a las 14 h de cultivo (63.32 UI/gX). Sin embargo, estos resultados no son congruentes con el análisis de respirometría, ya que a las 14 h el cultivo esta levadura todavía estaba en la fase de retardo, adaptándose aún al medio de cultivo.

En la Tabla 13 se muestra el efecto del aumento de todos los nutrientes del medio de cultivo sobre las fases de retardo, la velocidad de crecimiento, el rendimiento ($Y_{X/S}$), consumo de lactosa y rendimientos enzimáticos durante el CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278. Como se observa, la menor fase de retardo para ambas cepas se obtuvo con el medio de cultivo 1X. No hubo diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en la tasa de actividad respiratoria (μ_{CO_2}) al emplear los medios de cultivo 2X y 3X para la cepa NCYC 587 y la mayor μ_{CO_2} se obtuvo con el medio de cultivo 1X para ambas cepas ($0.36 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$), lo cual coincidió con la velocidad específica de crecimiento reportada en la literatura ($\mu = 0.35 \text{ h}^{-1}$) para *K. marxianus* NRRL-Y 1109 en CML a $29 \text{ }^\circ\text{C}$ empleando 50 g/L de lactosa (Cortes *et al.*, 2005). Los mejores rendimientos se obtienen con el medio de cultivo 1X para ambas cepas.

Tabla 13 Efecto del aumento en la concentración de todos los nutrientes sobre las fases de crecimiento del CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278.

Cepa	Medio de cultivo	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgs)
NCYC 587	1X	4±0.2 ^a	0.36±0.01 ^a	0.99	59.4±8 ^a	49.6±3.3 ^a	71.2±4.6 ^b	0.4±0.03 ^a
	2X	7.8±0.2 ^c	0.29±0.01 ^b	0.99	50.2±0.1 ^b	50.3±6.7 ^a	79.4±2.8 ^a	0.2±0.03 ^b
	3X	6.2±0.3 ^b	0.26±0.004 ^b	0.97	53.9±0.2 ^b	53.8±0.1 ^a	73.1±1 ^b	0.12±0.04 ^c
CDBBL 278	1X	13.7±0.5 ^a	0.36±.01 ^a	0.98	38.5±1.3 ^a	51.8±0.4 ^b	71.7±2.5 ^a	0.4±0.08 ^a
	2X	21.9±0.5 ^b	0.3±.01 ^b	0.96	28.8±2.4 ^b	59.9±3.5 ^a	65.7±1.3 ^b	0.25±0.03 ^b
	3X	18.6±0.5 ^c	0.15±.006 ^c	0.97	39.3±3 ^a	58.5±0.7 ^a	62.4±0.2 ^c	0.17±0.01 ^c

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) por cepa.

CONCLUSIONES

1. *Kluyveromyces marxianus* cepa NCYC 587 y CDBBL 278 fueron capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de lactosa y de nutrientes en el medio de cultivo.
2. *Kluyveromyces marxianus* cepa CDBBL 278 se vio más afectada por la presencia de altas concentraciones de lactosa y de nutrientes en el medio de cultivo, lo cual se reflejó en fases de retardo más largas, tasas de actividad respiratoria pequeñas, menor producción de biomasa, menor consumo de lactosa y de rendimientos de actividades enzimáticas de lactasa e inulinasa.
3. El rendimiento de actividad inulinasa obtenido con la cepa NCYC 587 (1064.1 UI/gX) es mayor a lo reportado en la literatura en CMS.

De acuerdo a los resultados hasta este punto, se observó que *Kluyveromyces marxianus* es capaz de crecer y transformar la lactosa en producto, ya sea biomasa o enzimas industrialmente importantes como lo son la lactasa y la inulinasa, así que se decidió probar esta capacidad empleando residuos agroindustriales como soporte natural y como sustrato un coproducto de la industria quesera como lo es el suero de leche, que contiene aproximadamente 6% de lactosa en su composición.

6.4 EFECTO DEL SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO, PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTES NATURALES EN EL CMS DE *K. marxianus*

6.4 EFECTO DEL SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO, PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTES NATURALES EN EL CMS DE *K. marxianus*

Las cepas de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 fueron cultivadas en medio sólido empleando suero de leche ultrafiltrado para eliminar las proteínas y la grasa presentes en el suero (preparado a partir de leche entera Santa Clara) y PUF como soporte sintético y bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo como soportes naturales. En este caso sólo se observó el crecimiento de la levadura con este sustrato y su efecto en la producción de biomasa. Los análisis se hicieron por triplicado y se trabajó con unidades experimentales independientes.

6.4.1 CMS DE *K. marxianus* EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO Y PUF COMO SOPORTE SINTÉTICO

El contenido de humedad inicial y final fue de 72.7 ± 0.3 y $68.9 \% \pm 1$, respectivamente y la A_w inicial y final fue de 0.994 ± 0.004 y 0.986 ± 0.001 , respectivamente, para ambas cepas. El pH inicial fue de 6.4 ± 0.02 y después de 20 h de cultivo el pH final fue de 6.4 ± 0.2 para ambas cepas. Hasta este momento no había sido posible controlar el pH y el suero de leche amortiguó el cambio del pH en el cultivo. Este sustrato presenta compuestos nitrogenados y sales y minerales en forma de citratos, cloruros, fosfatos y calcio (Alais, 1991; Badui, 1993; Riel, 1991) el cual puede amortiguar el pH en el cultivo.

En la Figura 31 se muestra la velocidad de formación de CO_2 de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 empleando suero de leche ultrafiltrado adicionado con las sales indicadas en el anexo A-1 y PUF como soporte sintético. En este caso se pudo observar que al adicionar suero de leche como sustrato las fases de retardo se acortan significativamente. La máxima velocidad de formación de CO_2 se obtiene en un corto tiempo de cultivo (5.5 h en promedio para ambas cepas). Esta diferencia en el perfil de CO_2 con respecto a los obtenidos en las secciones anteriores puede deberse a la composición misma del suero de leche, en donde se encuentran también vitaminas y iones como el magnesio, sodio, potasio, calcio, fierro, cobre y zinc (Alais, 1991; Badui, 1990; Reil, 1991), los cuales son esenciales para el crecimiento.

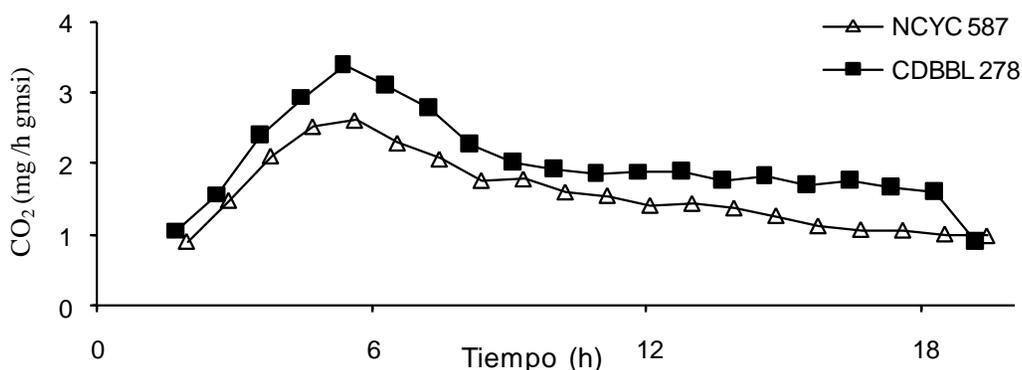


Figura 31 Efecto de utilización de suero de leche fresco como sustrato sobre la velocidad de formación de CO₂ de *K. marxianus* cepas NCYC 587 y CDBBL 278 en CMS.

En la Tabla 14 se muestra el efecto de la utilización de suero de leche fresco ultrafiltrado sobre las fases de retardo, las tasas de actividad respiratoria (μ_{CO_2}), el CO₂ total formado, la biomasa producida, el rendimiento ($Y_{X/S}$) y el consumo de lactosa del CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278. No hubo diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en las fases de retardo, tasa de actividad respiratoria (μ_{CO_2}) y CO₂ total formado para ambas cepas. La R² en la tabla 6.8 se refiere a la regresión lineal usada para la estimación de μ_{CO_2} . El suero de leche ultrafiltrado como sustrato favoreció la producción de biomasa, el consumo de lactosa y por consiguiente los rendimientos (Tabla 14) para ambas cepas.

El aumento en las variables principales del cultivo, sobre todo las tasas de actividad respiratoria, la producción de biomasa y los rendimientos, puede deberse a la composición del suero de leche, el cual aporta compuestos nitrogenados como la urea, vitaminas y minerales, lo que puede estar favoreciendo el cultivo de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278.

Los resultados de producción de biomasa y rendimiento son similares a los reportados en estudios anteriores (Tabla 12 y 13), mientras que las fases de retardo se acortan notablemente al emplear el suero de leche fresco.

Tabla 14 Efecto del suero de leche fresco como sustrato sobre las fases de crecimiento del CMS de *K. marxianus* NCYC 587 y CDBBL 278 con PUF como soporte sintético.

Cepa	Fase de retardo (h)	μ^{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg CO ₂ /g msi)	Biomasa producida (mg/gms)	Lactosa (mg/gms)		Rendimiento (Y _{x/s})
						Inicial	Final	
NCYC 587	2±0.1 ^a	0.64±0.1 ^a	0.99	40.3±14 ^a	58±1.1 ^a	182.4±4.2 ^a	1.8±0.01 ^a	0.32±0.06 ^a
CDBBL 278	1.8±0.2 ^a	0.7±0.02 ^a	0.99	39.3±3.2 ^a	60.5±5.7 ^a	187.7±3.2 ^a	3.8±0.02 ^b	0.33±0.03 ^a

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$)

CONCLUSIONES

1. El suero de leche permite amortiguar el pH del cultivo de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido.
2. Se obtienen tasas de actividad respiratoria altas en comparación con los estudios anteriores para ambas cepas.
3. Las variables principales del cultivo como la producción de biomasa, consumo de lactosa y rendimiento se mantienen constantes en comparación con estudios anteriores.

Debido a la rápida utilización de la lactosa y su conversión en biomasa, se decidió llevar a cabo estudios ahora con residuos agroindustriales como soportes naturales y suero de leche industrial como una aplicación biotecnológica de estos.

6.4.2 CMS DE *K. marxianus* EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTE Y PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD EN RUMIANTES.

Se llevaron a cabo estudios con residuos agroindustriales como son el bagazo de caña de azúcar y el rastrojo de sorgo como soportes naturales para determinar si la levadura era capaz de crecer en ellos empleando suero de leche ultrafiltrado proveniente de una quesería en Querétaro. Para este propósito, se llevaron a cabo CMS de *K. marxianus* con las cepas NCYC 587 y CDBBL 278, primero con bagazo de caña en reactor de charolas y posteriormente con la última cepa en columnas de fermentación, reactor de charolas y reactor de listones. Los resultados se presentan a continuación.

6.4.2.1 CMS DE *K. marxianus* CEPA NCYC 587 Y CDBBL 278 EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO COMO SUSTRATO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO SOPORTE NATURAL

Para ambas cepas, el contenido de humedad inicial y la A_w fueron de 78.5 ± 0.5 % y 0.993 ± 0.0005 , respectivamente, con un pH inicial de 5.57 ± 0.07 . Al final de los cultivos, el pH fue de 6.9 ± 0.06 para la cepa NCYC 587 y 6.29 ± 0.1 para la cepa CDBBL 278, mientras que el contenido de humedad y la A_w fueron de 71.6 ± 3 % y 0.988 ± 0.001 para ambos cultivos.

En la Fig. 32 se presentan los resultados de la velocidad de formación de CO_2 de *K. marxianus* cepas NCYC 587 y CDBBL 278 empleando suero de leche ultrafiltrado como sustrato y bagazo de caña como soporte natural. La máxima velocidad de formación de CO_2 para la cepa CDBBL 278 se alcanzó a las 10.2 h de cultivo ($12.7 \text{ mg CO}_2/\text{h gmsi}$). La temperatura máxima del cultivo superó los 40°C , como se observa en la Fig. 33. El perfil de la velocidad de CO_2 de esta levadura es similar al reportado en la sección anterior al emplear PUF como soporte sintético, pero en este caso la fase de retardo se alarga aproximadamente 1.3 h. Mientras que para la cepa NCYC 587 el perfil de CO_2 fue completamente diferente, mostrando dos máximos para la velocidad de formación de CO_2 a las 8.7 y 30.2 h (5.2 y $10.05 \text{ mg CO}_2/\text{h gmsi}$, respectivamente).

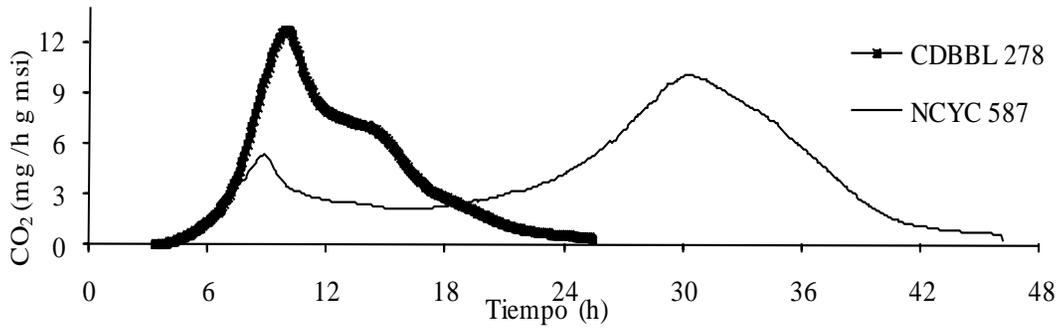


Figura 32 Efecto de utilización de suero de leche como sustrato y bagazo de caña como soporte sobre la velocidad de formación de CO₂ de *K. marxianus* cepas NCYC 587 (42 h de cultivo) y CDBBL 278 (24 h de cultivo) en reactor de charolas.

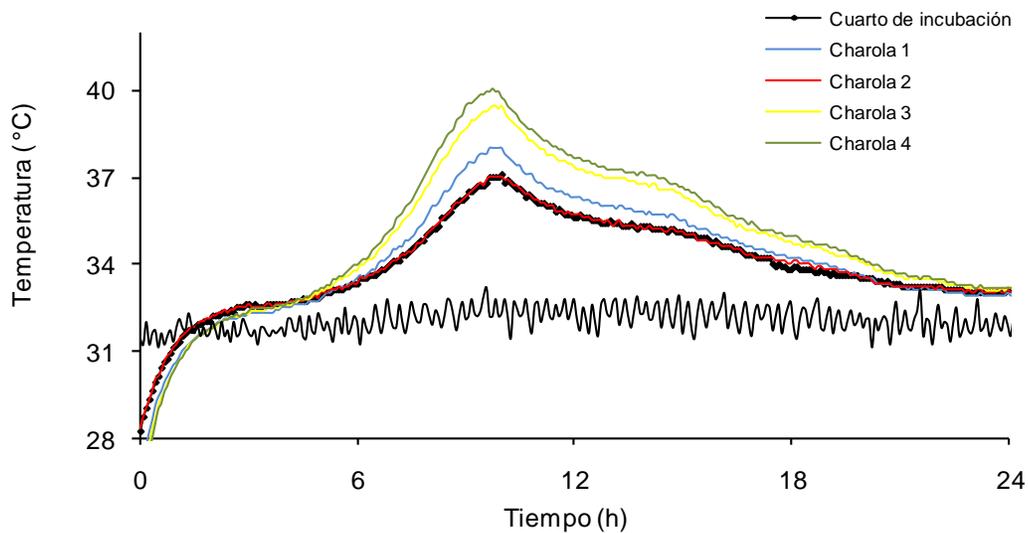


Figura 33 Temperatura del CMS de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 en reactor de charolas empleando bagazo de caña de azúcar como soporte.

El perfil de CO₂ mostrado por la cepa NCYC 587 es difícil de explicar, sin embargo, en este cultivo se logró disminuir la temperatura dentro del reactor de charolas al emplear 2 ventiladores al interior del reactor de charolas en el CMS de *K. marxianus* NCYC 587, como se observa en la Fig. 34, la cual no superó los 37 °C.

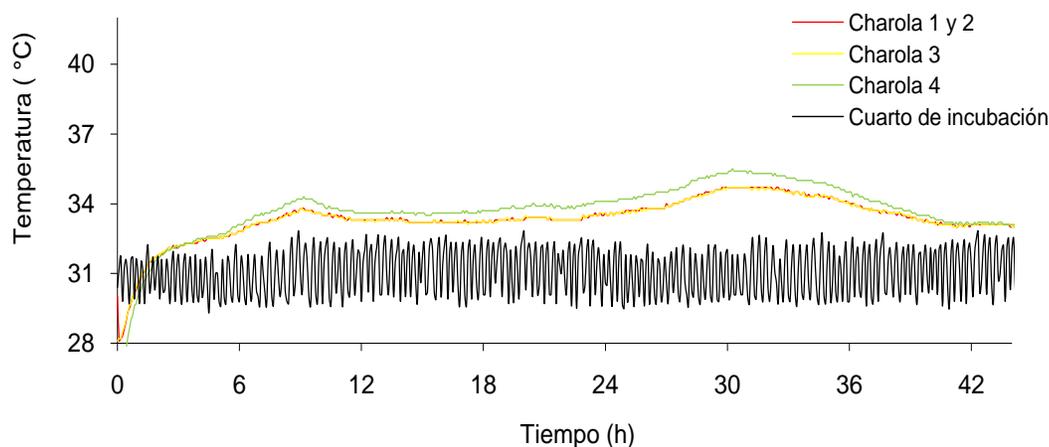


Figura 34 Temperatura del CMS de *K. marxianus* NCYC 587 en reactor de charolas empleando bagazo de caña de azúcar como soporte.

En la Tabla 15 se presenta el efecto de la utilización de bagazo de caña de azúcar como soporte natural en las variables principales del CMS de *Kluyveromyces marxianus* cepa NCYC 587 y CDBBL 278. En este caso se obtienen mayores tasas de actividad respiratoria para ambas cepas con bagazo de caña en comparación con los estudios reportados con suero de leche fresco ultrafiltrado y PUF. No se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa, consumo de lactosa y rendimientos para cualquier cepa estudiada. Estos resultados son similares a los reportados con suero de leche y PUF como soporte. De igual manera, se observa un aumento en la concentración de CO₂ total formado con respecto a estudios anteriores (Tabla 12, 13 y 14). Ambas cepas se adaptan rápido al medio de cultivo al tener fases de retardo muy cortas ya sea con PUF o bagazo de caña de azúcar como soporte (2 y 3 h, respectivamente).

Por otra parte, sí se presentaron diferencias significativas en los rendimientos de actividades de lactasa e inulinasa (Tabla 6.9), en donde la cepa CDBBL 278 presentó el mayor rendimiento de actividad lactasa (866.8 ± 73 UI/gX), mientras que la cepa NCYC 587 presentó el mayor rendimiento de actividad inulinasa (217.5 ± 25 UI/gX), a las 24 y 42 h de cultivo, respectivamente.

Los rendimientos de actividad lactasa para la cepa NCYC 587 representan sólo el 34 % de la actividad encontrada en el estudio con 20 % de urea en la fuente de nitrógeno (Tabla 10) y 2

veces más de la actividad encontrada con el medio de cultivo 1X (Fig. 28). Esta diferencia puede deberse al tiempo en que se midieron las actividades, los cuales no fueron los mismos (20, 32 y 36 h de cultivo, respectivamente), además las enzimas de levaduras son más propensas a desactivación ácida (Ladero *et al.*, 2003) y en este caso el pH al final del cultivo fue casi neutro a diferencia de los estudios anteriores. En cuanto al rendimiento de actividad enzimática de inulinasa para esta cepa, los títulos obtenidos representan un aumento del 94 % en comparación con lo obtenido en la sección 6.2.3, cuyo tiempo de cultivo fue de 32 h. Sin una cinética de actividad enzimática es difícil concluir acerca de estas diferencias en los títulos de actividad enzimática.

Por otra parte, comparando los rendimientos de actividad lactasa obtenidos en este estudio para la cepa CDBBL 278 con los obtenidos al adicionar 20 % de urea en la fuente de nitrógeno, estos representan el 76 % de la actividad encontrada en la sección 6.2.3 y un 90 % en comparación con la actividad encontrada al emplear el medio de cultivo 1X (sección 6.3.2.4). Así mismo, comparando los rendimientos de actividad inulinasa con estudios anteriores, estos representan sólo el 46 % de la actividad obtenida con 20 % de urea en la fuente de nitrógeno (sección 6.2.3).

Dado que la producción de enzimas depende del tiempo, estas diferencias en los rendimientos de actividad lactasa e inulinasa pueden deberse a que los tiempos de cultivo variaron dependiendo del estudio realizado. De igual manera se tendrían que llevar a cabo los estudios bajo las mismas condiciones para poder determinar en qué tiempo se presenta el mayor rendimiento de actividad para esta levadura en CMS empleando bagazo de caña de azúcar como soporte y suero de leche ultrafiltrado como sustrato para mantener el pH inicial, ya que la enzima es capaz de mantener una alta actividad a pH de 6 y hasta 10.7 (Ladero *et al.*, 2005).

Tabla 15 Efecto del soporte en las variables principales del CMS de *K. marxianus* cepas NCYC 587 y CDBBL 278 en reactor de charolas.

Cepa	Fase retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/gmsi)	
				Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
NCYC 587	3.3	0.83	0.99	8.3±1 ^a	217.5±25 ^a
CDBBL 278	3.3	0.85	0.99	5.7±0.4 ^a	110.4±3 ^b

Cepa	Biomasa (mg x/gms)	Consumo de lactosa (%)	Y _{x/s}	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
NCYC 587	46.4±1.4 ^a	100±0.002 ^a	0.3±0.03 ^a	701.5±91 ^b	8.3±1 ^a	217.5±25 ^a
CDBBL 278	42.6±1.3 ^a	100±0.003 ^a	0.27±0.03 ^a	866.8±73 ^a	5.7±0.4 ^a	110.4±3 ^b

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$)

CONCLUSIONES

1. Las dos cepas fueron capaces de crecer sobre bagazo de caña como soporte, con un consumo total de la lactosa presente en el suero de leche.
2. Las tasas de actividad respiratoria así como el CO₂ total formado obtenidos son mayores a las reportadas en estudios anteriores.
3. La regulación del pH jugó un papel muy importante en la producción de la actividad lactasa y probablemente se debió al suero de leche y al rastrojo de sorgo que permite amortiguar de manera natural los cambios de pH.

De acuerdo a los perfiles de CO₂, se decidió emplear la cepa CDBBL 278 para una escala mayor en CMS para los estudios con rastrojo de sorgo y suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato, pasando de columnas de fermentación y reactor de charolas a escala laboratorio a un reactor agitado con listones helicoidales a escala semipiloto. Los resultados se presentan a continuación.

6.4.2.2 CMS DE *K. marxianus* CEPA CDBBL 278 EMPLEANDO SUERO DE LECHE ULTRAFILTRADO INDUSTRIAL COMO SUSTRATO Y RASTROJO DE SORGO COMO SOPORTE NATURAL

Se llevaron a cabo CMS empleando la cepa CDBBL 278 de *K. marxianus* utilizando rastrojo de sorgo (cosecha 2007) como soporte natural y suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato, proveniente del Establo Michintepéc, Pedro Escobedo, Qro. Los ensayos fueron realizados en columnas de fermentación, reactor de charolas y reactor de listones. Ningún material fue esterilizado para simular las condiciones de campo y poder aplicar el fermentado como parte de alimento para rumiantes. La concentración de lactosa proveniente del suero de leche industrial fue de 48 g/L (aproximadamente 182 mg/gms).

El contenido de humedad inicial y la A_w en los tres sistemas fueron de 72.9 ± 0.1 % y 0.99 ± 0.003 , respectivamente, con un pH inicial de 5.57 ± 0.07 . El pH al final de los cultivos fue de 6.29 ± 0.03 en columnas de fermentación, 6.29 ± 0.1 en reactor de charolas y 6.9 ± 0.09 en reactor de listones, mientras que el contenido de humedad y la A_w final fueron de 66.5 ± 2.9 % y 0.986 ± 0.003 en columnas de fermentación, 69.5 ± 0.2 % y 0.986 ± 0.002 en reactor de charolas y 68.1 ± 1.9 % y 0.989 ± 0.0043 en reactor de listones. Al igual que en el estudio con bagazo de caña de azúcar, en este caso se logra amortiguar el pH del cultivo de la levadura.

En la Fig. 35 se muestran la velocidad de formación de CO_2 de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 en CMS en columnas de vidrio, reactor de charolas y reactor de listones. Independientemente del sistema de cultivo empleado, la levadura fue capaz de crecer y de presentar perfiles de CO_2 similares en cada sistema de estudio. Las fases de adaptación en los dos primeros sistemas de cultivo son de aproximadamente 9 h y de 11.9 h con el reactor de listones. La producción máxima de CO_2 en el cultivo en columnas de fermentación y en reactor de listones mostró un retraso de 4 y 7 h, respectivamente, en comparación con el cultivo en reactor de charolas.

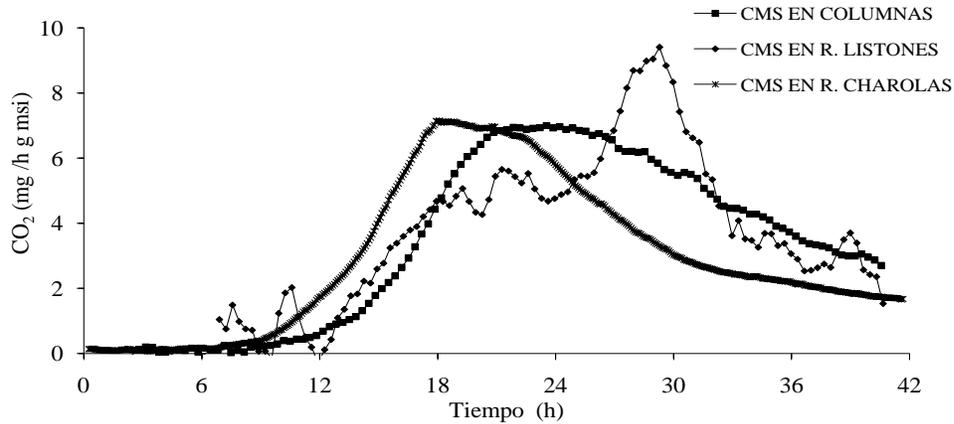


Figura 35 Efecto de utilización de suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato y rastrojo de sorgo como soporte sobre la velocidad de formación de CO₂ de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 en CMS en columnas de vidrio, reactor de charolas y reactor de listo.

La temperatura máxima del cultivo en el reactor de charolas (el cual fue el único que se pudo monitorear) se presentó a las 22 h y no superó los 37 °C (Fig. 36). En este sistema de cultivo el mantenimiento es mayor, lo cual podría explicar el incremento en la temperatura del cultivo. En este caso también se emplearon 2 ventiladores para evitar el aumento en la temperatura dentro del reactor de charolas, debido al aumento de la turbulencia del aire al interior del fermentador.

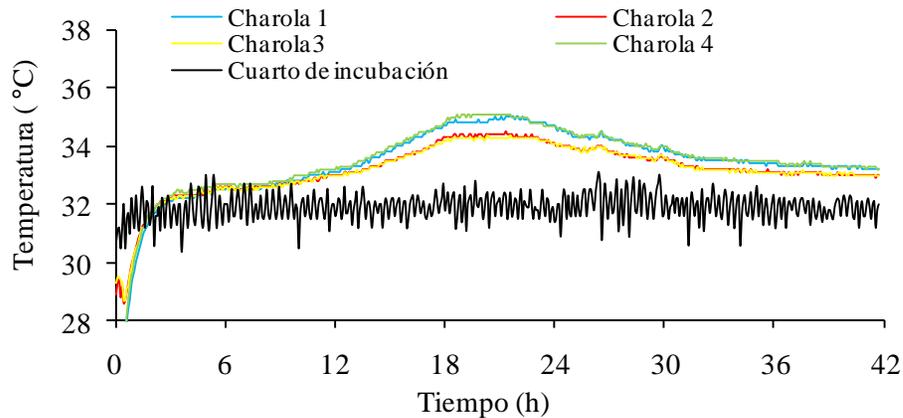


Figura 36 Temperatura del CMS de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 en el reactor de charolas empleando rastrojo de sorgo como soporte natural.

En la Tabla 16 se presentan los resultados del CMS de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 empleando suero de leche ultrafiltrado industrial como sustrato en los tres sistemas de cultivo. Las menores fases de retardo así como la mejor tasa de actividad respiratoria se presentaron al emplear las columnas de fermentación y el reactor de charolas.

Independientemente del sistema de cultivo, el consumo de lactosa fue del 100 %, sin embargo hubo una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) al emplear el reactor de charolas, lo cual se vio reflejado en una mayor producción de biomasa (54 ± 3.8 mgX/gms), mejor rendimiento (0.36 ± 0.02) y mayores rendimientos de actividad lactasa (1754.7 ± 80 UI/g X) e inulinasa (166.1 ± 25.2 UI/gX) en comparación con el cultivo en columnas de fermentación y en el reactor de listones (Tabla 16). Independientemente del sistema de cultivo empleado, los títulos de actividad lactasa son mayores a los reportados en la sección 6.2 y 6.3 para esta cepa en columnas de fermentación con PUF como soporte. El título de actividad lactasa obtenido en este estudio superó los resultados reportados en la sección 6.2 (1147.3 UI/gX) y en CML reportado por Espinoza y col en 1992 (1590 UI/gX). Esto pudo deberse a que el cultivo en el reactor de charolas estuvo mejor aireado (1.5 vkgm), mientras que en las columnas de fermentación la aireación fue de 0.5 vgm y de acuerdo a la literatura la aireación favorece la producción de la enzima (Hewitt *et al.*, 1984). De igual manera, los valores de biomasa así como el consumo de sustrato y rendimiento de biomasa son similares a los encontrados al emplear suero fresco y PUF (Tabla 14) y suero de leche fresco y bagazo de caña (Tabla 15).

En este caso el pH jugó un papel importante en la producción enzimática. Existen reportes en donde se ha estudiado el efecto del pH en la producción de la lactasa y se ha observado que a pH 6 (el cual es el pH del suero dulce) la enzima muestra la máxima actividad y estabilidad (Ladero *et al.*, 2005). Comparando estos resultados con los de las secciones anteriores, podemos decir que la lactasa producida por *Kluyveromyces marxianus* presenta este mismo comportamiento.

Tabla 16 Características del CMS de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 usando suero de leche ultrafiltrado industrial y rastrojo de sorgo como soporte en diferentes sistemas de cultivo (36 h de cultivo).

CMS	Escala (gms)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/gmsi)
Columnas	10	7.5±0.2	0.33±0.02	0.99	123±11.3
Charolas	550	7.7	0.35	0.99	133.3
Listones	2,500	11.9	0.29	0.99	121.6

CMS	Escala (gms)	Biomasa (mgX/gms)	Consumo de lactosa (%)	Y _{X/S}	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa (UI/gX)
Columnas	10	40±3.4 ^b	100±0.0 ^a	0.23±0.05 ^b	1432.9±52 ^b	126.8±14.7 ^a
Charolas	550	54±3.8 ^a	100±0.01 ^a	0.36±0.02 ^a	1754.7±80 ^a	166.1±25.2 ^a
Listones	2,500	35.3±6.6 ^b	100±0.02 ^a	0.26±0.05 ^b	1103±40 ^c	143.5±21.3 ^a

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$)

Existen reportes en donde el factor de escala es importante ya que es difícil mantener algunos parámetros del proceso constantes (Nava *et al.*, 2006). En nuestro caso observamos que cuando cambiamos de escala en un factor de 13.8 en columnas de fermentación a un factor de 250 en reactor de listones, las tasas de actividad respiratoria, el CO₂ total formado, la producción de biomasa, el consumo de sustrato así como los rendimientos de biomasa y de actividades enzimáticas se mantienen constantes.

En el anexo A-5 se presenta una tabla comparativa de los balances de carbono (C) del CMS de *K. marxianus* empleando suero de leche, PUF, bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo (Tabla 26). Es posible que se esté sobreestimando el CO₂ porque los sistemas de cultivo cambian de columnas de fermentación a reactores. Sin embargo, los valores de recuperación de carbono en forma de biomasa se mantienen constantes al cambiar de sistema de cultivo.

CONCLUSIONES

1. *Kluyveromyces marxianus* cepa CDBBL 278 fue capaz de crecer sobre rastrojo de sorgo como soporte natural y suero de leche ultrafiltrado industrial.
2. Al cambiar el factor de escala, las tasas de actividad respiratoria, el CO₂ total formado, la producción de biomasa, el consumo de sustrato así como los rendimientos de biomasa y de actividades enzimáticas se mantienen constantes.
3. Los rendimientos de actividad lactasa (1433 ± 15 y 1754.7 ± 80 UI/gX) en cultivo en columnas y en reactor de charolas, respectivamente para la cepa CDBBL 278 son mayores a los obtenidos en trabajos anteriores reportados en esta tesis (1147 UI/gX) y en CML (1590 UI/gX) para esta cepa.

6.4.2.3 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD DEL CMS DE *K. marxianus* CEPA CDBBL 278 EN REACTOR DE CHAROLAS.

El material fermentado en reactor de charolas de *K. marxianus* cepa CDBBL 278 con rastrojo de sorgo cosecha 2007 (36 h de CMS) fue usado para realizar ensayos de digestibilidad. Una porción fue sometida a tratamiento térmico con vapor directo en autoclave a 90 °C por 10 min y otra sin tratamiento térmico. Se realizaron los mismos tratamientos al rastrojo de sorgo como control. Posteriormente, todos los materiales se secaron a temperatura ambiente hasta un contenido de humedad aproximado del 6-8% para realizar las pruebas de digestibilidad en bovinos. Esta parte del estudio se realizó con apoyo del Dr. Marcos Meneses Mayo del Colegio de Posgraduados. Los análisis se hicieron por duplicado en dos bloques (Anexo A-3). Los resultados se presentan a continuación.

6.4.2.3.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

En la Tabla 17 se presentan los resultados de la composición bromatológica de los materiales de estudio. El contenido de minerales aumentó en los materiales fermentados por el suero de leche y por la fermentación propia de la levadura. Los tratamientos fermentados mostraron mayor contenido de proteína, la cual provino de la fuente de nitrógeno utilizada por la levadura. También se pudo observar que los materiales después de ser fermentados con levadura disminuyeron la fracción de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) lo que indica que hay un efecto positivo del microorganismo en el consumo de carbohidratos estructurales (Rojo *et al.* 2007). Está reportado que *Kluyveromyces marxianus* presenta actividad hidrolasa, la cual puede estar atacando la celulosa presente en el rastrojo de sorgo, facilitando la asimilación de la fibra (Bamby *et al.*, 1990; Barron *et al.*, 1995; Barron *et al.*, 1997; Boyle *et al.*, 1997; Ballesteros *et al.*, 2002; Ballesteros *et al.*, 2004).

Tabla 17 Análisis bromatológico de materiales fermentados y controles con y sin tratamiento térmico.

Muestra	MS (%)	MIN (%)	MO (%)	PROT (%)	FDN (%)	FDA (%)
CDBBL278 con TT	94±0.06 ^b	15±0.1 ^b	79±0.08 ^b	6.7±0.2 ^a	80.2±1 ^b	54.4±0.7 ^a
CDBBL 278 sin TT	93.2±0.04 ^c	15.9±0.1 ^a	77.2±0.08 ^c	6.6±0.2 ^a	77.7±1 ^a	54.7±0.7 ^a
Sorgo con TT	96±0.04 ^a	12.1±0.3 ^c	83.5±0.3 ^a	3.1±0.07 ^b	83.3±0.9 ^c	54.8±0.7 ^a
Sorgo sin TT	91.5±0.04 ^d	12.1±0.3 ^c	79.4±0.3 ^b	2.7±0.07 ^b	82.4±0.9 ^c	59±0.7 ^b

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$)

MS=Materia Seca; MIN=Minerales; MO=Materia Orgánica; PROT=Proteína; FDN=Fibra Detergente Neutro; FDA=Fibra Detergente Ácida; TT= Tratamiento Térmico.

Existen estudios en donde se muestra que el tratamiento térmico por explosión de vapor incrementa la digestibilidad de los forrajes de baja calidad, lo que está relacionado con la solubilización de la FDN y hemilcelulosa, permitiendo una mayor digestión de componentes de la pared celular; sin embargo cada forraje o subproducto es diferente y por tanto la fractura celular por emisión de vapor los fragmenta diferente; esto depende del grado de lignificación del material vegetal (Cortez, 1992). En este estudio no se observó el mismo comportamiento, ya que la finalidad del tratamiento térmico era la de minimizar el contenido de ácidos nucleicos presentes en el fermentado, ya que estos compuestos pueden provocar un aumento en el contenido de ácido úrico en los rumiantes, sin embargo en este caso no se llevaron a cabo estudios para verificarlo.

Por otra parte, además de la colonización bacteriana, las enzimas exógenas amilolíticas (endo y exoamilasas) y fibrolíticas (xilanasas, celulasas y β -glucanasas de *Aspergillus niger*) pueden estimular la actividad enzimática endógena del rumen (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002a; Ingle y Erickson, 1978; Helbert *et al.*, 1996; Rojo *et al.* 2005; Rojo *et al.*, 2007). Estudios preliminares han demostrado que el suministro directo de microorganismos de origen fúngico en el alimento como *Aspergillus oryzae* (el cual produce amilasas), aumenta el número de bacterias en el rumen. El mecanismo de dicha estimulación no está totalmente claro pero se cree que el suministro directo de microorganismos aporta factores de crecimiento, necesarios

para las bacterias del rumen (Martín y Nisbet, 1992), modera el bajo pH del rumen o suministra enzimas fibrolíticas exógenas (Newbold, 1995). Se ha sugerido que el aumento de la población de bacterias celulolíticas, es el elemento responsable del aumento de la digestión del forraje, cuando se suministran microorganismos directamente en el rumen. De igual manera, Aranda en el 2000 observó un efecto sinérgico en el crecimiento microbiano en la caña de azúcar y sus fracciones de FDN y FDA, al adicionar Fibrozyme® (0.1 g/g de sustrato) durante 8.5 h de incubación *in vitro*. El rastrojo de maíz tratado con Fibrozyme® (1.5 g kg⁻¹), tuvo una mayor digestibilidad *in vitro* de MS (Tirado-Estrada *et al.*, 2001). En estos casos, las investigaciones *in vitro* sugieren una acción sinérgica de los microorganismos ruminales, con el producto enzimático en la degradación de la fibra.

En nuestro estudio, los análisis bromatológicos indicaron que la levadura presente en el material fermentado degrada fracciones fibrosas del sorgo. Está reportado que *Kluyveromyces marxianus* presenta actividad celulósica (Raynal y Guerineau, 1984), la cual ataca a la celulosa presente en el rastrojo de sorgo, facilitando la asimilación de la fibra (Bamby *et al.*, 1990; Barron *et al.*, 1995; Barron *et al.*, 1997; Boyle *et al.*, 1997; Ballesteros *et al.*, 2002; Ballesteros *et al.*, 2004).

6.4.2.3.2 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD

Los datos del análisis bromatológico sugieren que este tipo de productos fermentados pueden aprovecharse como componentes en la dieta de rumiantes, por lo que se realizó un estudio de digestibilidad *in vitro* e *in situ* de la materia seca (DIVMS) en bovinos. Para este propósito se empleó fluido ruminal fresco extraído de una vaca con cánula ruminal y alimentada con alfalfa fresca (60 %) y ensilado de maíz (40 %). Para mayor información consultar anexo A-3.1. Las gráficas correspondientes a esta sección se encuentran en el anexo A-6.

El pH (Anexo A-6.1) se mantuvo constante durante la cinética de digestibilidad *in vitro*, iniciando con un valor de 7.3 y terminando en 7.6±0.1. Mientras que el nitrógeno amoniacal tuvo un aumento drástico a las 12 h de digestibilidad (anexo A-6.2) lo cual coincidió con el aumento en el pH y estabilización del mismo, posiblemente el nitrógeno amoniacal fungió como amortiguador. El nitrógeno amoniacal es importante porque sostiene la síntesis de

proteína microbiana y optimiza la utilización y el consumo de alimentos fibrosos de baja calidad (Leng, 1990).

El objeto de la prueba de digestibilidad *in situ* de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA), es tener mayor precisión en lo que ocurre al interior del rumen de pequeños rumiantes (ver anexo A-6.4, 6.5 y 6.6, respectivamente).

No se observó diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en las cinéticas de digestibilidad *in vitro* e *in situ* para las condiciones estudiadas. Sin embargo, la digestibilidad *in situ* aumentó 15.4 % en comparación al ensayo *in vitro*.

CONCLUSIONES GENERALES

1. El suero de leche ultrafiltrado permitió amortiguar el pH en el cultivo de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido.
2. El suero de leche ultrafiltrado como sustrato mejora algunos de los parámetros del cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, sobre todo el rendimiento de biomasa y consumo de la lactosa presente en el suero de leche así como la tasa de actividad respiratoria.
3. Los tratamientos fermentados presentaron mayor contenido de proteína por acción microbiana y los porcentajes de digestibilidad obtenidos muestran que este residuo sólo o mezclado con la levadura puede ser un buen componente en la dieta de rumiantes.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestro sistema experimental modelo nos permitió determinar las mejores condiciones para el CMS de *Kluyveromyces marxianus*, empleando lactosa como fuente de carbono y energía en una concentración de 50 g/L, un inóculo de 2.5×10^6 cel/gms, el uso de amortiguador de fosfatos de potasio en la preparación del medio de cultivo y una concentración del 20% de urea en la fuente de nitrógeno.

Este sistema permitió determinar que altas concentraciones de lactosa y nutrientes afectan de manera negativa a las variables principales del cultivo como son: las fases de retardo, las tasas de actividad respiratoria, la producción de biomasa y consumo de lactosa así como las actividades enzimáticas de lactasa e inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido.

Así mismo, se mostró que al emplear suero de leche ultrafiltrado como sustrato, se amortigua el pH del cultivo y se favorece el consumo de lactosa, la producción de biomasa, el rendimiento celular y la expresión de las actividades enzimáticas de lactasa e inulinasa en el CMS de *K. marxianus*. De igual manera, al trabajar con un sistema de cultivo empleando suero de leche ultrafiltrado y bagazo de caña de azúcar o rastrojo de sorgo como soportes naturales se mantienen constantes las variables principales del cultivo, obteniendo rendimientos de actividad lactasa e inulinasa mayores a los obtenidos en CML para *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 y manteniendo los valores de recuperación de carbono en forma de biomasa constantes al cambiar de sistema de cultivo.

Por último, mediante estos procesos de bioconversión se pueden aprovechar algunos coproductos de la industria láctea y agrícola al emplear el suero de leche, el bagazo de caña o el rastrojo de sorgo en el cultivo de esta levadura como ingrediente en la dieta de animales rumiantes, con lo cual se le puede dar una aplicación biotecnológica a este tipo de materiales y evitar en la medida posible más contaminación derivada de los mismos.

Es importante realizar estudios a futuro sobre optimización del medio de cultivo y el empleo de inductores que favorezcan los mayores rendimientos y mejores títulos de actividad tanto

lactasa como inulinasa, llevando a cabo cinéticas de cultivo para una mejor caracterización del cultivo de *Kluyveromyces marxianus* en medio sólido.

Se recomienda optimizar las condiciones de cosecha y tratamiento de residuos agroindustriales, asegurando una mayor digestibilidad de los mismos, lo cual repercute en el crecimiento y producción del animal.

Se presenta evidencia experimental indicando que es posible establecer las condiciones nutricionales de cultivo para *Kluyveromyces marxianus* en un sistema modelo, permitiendo extrapolar los resultados a un sistema más cercano a la realidad.

El CMS presenta potencial en resolver problemas ambientales y contribuir parcialmente a la producción de alimentos para rumiantes.

8. REFERENCIAS

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

1. Aktas, N., Boyaci, I., Mutlu, M. y Tanyolac, A., 2005. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Biores. Technol.* **97**:2252-2259.
2. Alais, C., 1991. Ciencia de la leche, principios de Técnica lechera, Edt. CECSA, México, D.F.
3. Anderson, P., McNeil, K. y Watson, K., 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1314-1320.
4. [AOAC, 1995](#), 1996. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC International, Washington, DC.
5. Aranda, E. M. 2000. Utilización de la caña de azúcar en la alimentación de rumiantes. Tesis Doctoral. FMVZ., Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM. México, D. F. p.90.
6. Bacci, J., Siqueira, C., Antoniazzi, S. y Ueta, J., 1996. Location of the β -galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC10022. *Antonie van Leeuwenhoek.* **69**:357-361.
7. Badui, S., 1993. Química de los Alimentos. 3a edición. Edit. Alhambra Universitaria, México, D.F.
8. Bajpai, P. y Margaritis, A., 1982. Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke juice. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:1325-1329.
9. Ballesteros, M., Olivia, J., Negro, M., Manzanares, P. y Ballesteros, M., 2002a. Simultaneous saccharification and fermentation process for converting the cellulosic fraction of olive oil extraction residue into ethanol. *Grasas y Aceites.* **53**:282-288.
10. Ballesteros, M., Olivia, J., Negro, M., Manzanares, P. y Ballesteros, M., 2002b. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**:559-561.
11. Ballesteros, M., Olivia, J., Negro, M., Manzanares, P. y Ballesteros, M., 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem.* **39**:1843-1848.
12. Banat, I., Nigam, P. y Marchant, T., 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeast growing at 52 °C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**:259-263.
13. Barberis, S. y Gentina, J., 1998. Effects of dissolved oxygen level on lactase production by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **73**:71-73.
14. Barberis, S. y Segovia, R., 1997. Dissolved oxygen concentration-controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture. *Biotechnol. Techniques.* **11**(11):797-799.
15. Barberis, S. y Segovia, R., 2002. Maximum volumetric production of β -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis* in fed-batch culture with automatic control. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**:706-710.
16. Barnby, F., Morpeth, F. y Pyle, D., 1990. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **12**:891-897.
17. Barnett, J., Payne, R. y Yarrow, D., 1983. Yeast: characteristics and identification. *Cambridge University Press*, Cambridge.

18. Barranco-Flrido, E., García-Garibay, M., Gómez-Ruíz, L. y Azaola, A., 2001. Immobilization system of *Kluyveromyces marxianus* cells in barium alginate for inulin hydrolysis. *Proc. Biochem.* **37**:513-519.
19. Barron, N., Marchant, R., McHale, L. y McHale, A., 1995a. Partial characterization of β -glucosidase activity produced by *Kluyveromyces marxianus* IBM3 during growth on cellobiose containing media at 45 °C. *Biotechnol. Lett.* **17**:1047-1050.
20. Barron, N., Marchant, R., McHale, L. y McHale, A., 1995b. Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:518-520.
21. Barron, N., Marchant, R., McHale, L. y McHale, A., 1996. Ethanol production from cellulose at 45 °C using a batch-fed system containing alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IBM3. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**:103-104.
22. Barron, N., Mulholland, H., Boyle, M. y McHale, A., 1997. Ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* IBM3 during growth on straw-supplement whiskey distiller spent wash at 45 °C. *Bioproc. Eng.* **15**:275-277.
23. Becerra, M., Rodríguez, B., Esparza, C. y González-Siso, I., 2004. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media. *J. Biotech.* **109**:132-137.
24. Belem, M. y Lee, B., 1998. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38**:598-656.
25. Belem, M. y Lee, B., 1999. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochem.* **34**:501-509.
26. Belem, M., Gibbs, B. y Lee, B., 1997. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *J. Food Sci.* **62**:851-857.
27. Bellaver, L., de Carvalho, N., Abrahao-Neto, J. y Gombert, K., 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Research.* **4**:691-698.
28. Bender J., Mazutti, M., Oliveira, D., Treichel, H., Di Luccio, M., 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571 using solid state fermentation. *Appl. Biochem. Biotech.* **32**:951-958.
29. Blanco, P., Sieiro, C. y Villa, T., 1999. Production of pectin enzymes in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**:1-9.
30. Boyle, M., Barron, N. y McHale, A., 1997. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the yeast strain thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IBM3. *Biotechnol. Lett.* **19**:49-51.
31. Boze, H., Guyot, J. y Galzy, P., 1989. Isolation and characterization of a derepressed mutant of *Schwanniomyces castelli* for amylase production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:366-370.
32. Brand, D, Pandey, A, Roussos, S y Soccol, R. 2000. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme Microb Technol.* **27**:127-133.
33. Brady, D., Marchant, R., McHale, L. y McHale, P., 1995. Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme Microb. Technol.* **17**:696-699.
34. Carrizales, V. y Rodríguez, H., 1981. Determination of the specific growth rate of models on semi solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:321-323.

35. Carvalho- Silva, M. y Spencer-Martins, I., 1990. Modes of lactose uptake in the yeast species *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **57**:77-81.
36. Castellanos, R., Llamas, L. y Shimada, A., 1990. Manual de Técnicas de Investigación en Ruminología. México. pp. 29-34.
37. Castillo, J., 1990. Lactose metabolism by yeasts. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*. Marcel, Dekker., Nueva York. pp:297-320.
38. Castillo, J. y Ugalde, U., 1993. Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:386-393.
39. Chahal, D., 1983. Fundamentals in Biochemical Engineering kinetics and thermodynamics in biological systems. American Chemical Society Symposium series, vol. **207**. American chemical Society, Washington, DC. p.421.
40. Classen, J., Engler, C., Kenerley, C. y Whittaker, A., 2000. A logistic model of subsurface fungal growth with application to bioremediation. *J. Environmental Science and Health*. **4**: 465-488.
41. Clementi, F. y Rossi, J., 1986. α -amylase and glucoamylase production by *Schwanniomyces castelli*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **52**:343-352.
42. Cochet, N., Nonus, M. y Lebeault, J., 1988. Solid-state fermentation of sugar-beet. *Biotech. Lett.* **10**(7):491-496.
43. Corpillo, D., Valetti, F., Giuffrida, M., Conti, A. Y Giunta, C., 2003. Introduction and characterization of a novel amine oxidase from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*. **20**:369-379.
44. Cortés, G., Trujillo-Roldán, A., Ramírez, T. y Galindo, E., 2005. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. *Process Biochem.* **40**:773-778.
45. Cortéz, L., Bezzon, G., Olivares, E., Brossard, L. y Penedo, M., 1992. Pirolisis al vacío de bagazo de caña de azúcar. UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
46. Cruz-Guerrero, A., García-Peña, I., Bázana, E., García-Garibay, M. y Gómez-Ruíz, L., 1995. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain. *J. Ferm. Bioeng.* **80**:159-163.
47. Cruz-Guerrero, A., Bázana, E., García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, L., 1999. Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochem.* **34**:621-624.
48. Cruz-Guerrero, A., Olvera, J., García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, L., 2006. Inulinase-hyperproducing strain of *Kluyveromyces* sp. Isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**:115-117.
49. Daniel, W., 2002. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1º reimpression de la 4 ° Ed. Limusa S.A. de C.V. México, D.F. pp. 322-322.
50. De Sánchez, S. y Castillo, F., 1980. Effect of pH on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on deproteinized whey. *Acta Cient. Venez.* **31**:24-26.
51. Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric Method for the Determination of Sugar and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
52. Durand, A. y Chereau, D., 1988. A new pilot reactor for solid state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.* **31**:476.

53. Espinoza, P., Bázquez, E., García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, L., 1992. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. *Biotechnol. Lett.* **14**(11):1053-1058.
54. Etschmann, M. y Schrader, J., 2006. An aqueous-organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:440-443.
55. Fabre, C., Blanc, P. y Goma, G., 1998. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Prog.* **14**:270-274.
56. Fabre, C., Duviols, V., Blanc, P. y Goma, G., 1995. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **17**:1207-1212.
57. Fernandes, P., Keen, J., Findlay, J. y Moradas-Ferreira, P., 1992. Protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculation *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1159**:67-73.
58. Fernandes, P., Souza, M. y Moradas-Ferreira, P., 1993. Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast.* **9**:859-866.
59. Ferrari, M., Loperena, L. y Varela, H., 1994. Ethanol production from concentrated whey permeates using a fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Microbiol. Pol.* **43**:57-65.
60. Fonseca, A., Spenser-Martins, I. y van Uden, N., 1991. Transport of lactic acid in *Kluyveromyces marxianus*: evidence for a monocarboxylate uniport. *Yeast.* **7**:775-780.
61. Fonseca, G., Heinzle, H., Wittman, C. y Gombert, A., 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**:339-354.
62. Furlan, S., Schneider, A., Merkle, R., Carvalho, J. y Jonas, R., 2000. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -d-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **22**:589-593.
63. García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. y Bázquez, E., 1987a. Studies on the simultaneous production of single-cell protein and endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.* **9**:411-416.
64. García-Garibay, M., Torres, J., Munguía, L. y Casas, L., 1987b. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **9**:417-420.
65. Gekas, V. y López-Leiva, M., 1985. Hydrolysis of lactose. A literature review. *Proc. Biochem.* **20**:2-12.
66. Ghaly, A. y Ben-Hassan, R., 1995. Kinetics of batch production of single-cell protein from cheese whey. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50**:79-92.
67. Gómez, A. and Castillo, J., 1983. Production of biomass and β -D-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. *Biotechnol. Bioeng.* **25**:1341-1357.
68. Goncalves, J. y Castillo, F., 1982. Partial purification and characterization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Sci.* **65**:2088-2094.
69. González-Siso, M. I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores Technol.* **57**:1-11.
70. González-Siso, M. y Suárez, S., 1994. *Kluyveromyces lactis* immobilization on Cork grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* **16**:303-319.

71. Gough, S., Barron, N., Zubov, A. y Lozinsky, V., 1998. Production of ethanol from molasses at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IBM3 immobilized in calcium alginate gels and poly (vinyl alcohol) cryogel. *Bioproc. Eng.* **19**:87-90.
72. Grubb, C. y Mawson, J., 1993. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnol. Lett.* **15**:621-626.
73. Gurpreet, K., Panesar, P., Bera, B. y Kumar, H., 2009. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. *Bioprocess Biosyst Eng.* **32**:63-67.
74. Hack, C. y Marchant, R., 1998. Characterization of novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*: Development of an ethanol fermentation process. *J. Industrial Microbiology & Biotechnology.* **20**:323-327.
75. Hack, C., Banat, I., Singh, D. y Marchant, R., 1994. Ethanol production by a strain of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperatures in various bioreactor configurations. In: Proceedings of Conference on Fermentation Physiology, Pub. Institution of Chemical Engineers, Brighton, UK. pp.7-9.
76. Harden, T. J., 1996. The reduction of BOD and production of biomass from acid whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Food Aust.* **48**:456-457.
77. Harsa, S., Zaror, C. y Pyle, D., 1993. Production of polygalacturonases from *Kluyveromyces marxianus* fermentation-preliminary process design and economics. *Proc. Biochem.* **28**:187-195.
78. Helbert W, Schulein M, Henrissat B (1996) Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* alpha-amylases into corn starch granules. *Intl. J. Biol. Macr.* **19**: 165-169.
79. Helrich, K., 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Journal of Association of official analytical chemists. Washington, DC. **73**(6): 849-859.
80. Hewitt, G. y GrootWassink, W., 1984. Simultaneous production of inulinase and lactase in batch and continuous cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiol. Technol.* **6**:263-270.
81. Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H. y Tamaki, H., 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J. Biotechnol.* **130**:114-123.
82. Hoogschanger, M., Zhu, Y., van as, H., Tramper, J. y Rinzema, A., 2001. Influence of wheat type and pretreatment on growth in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* **23**(14):1183-1187.
83. Hughes, D., Tudrosaen, N. Y Moye, C., 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* **6**:1-6.
84. Ia, J. y Wheals, A., 2000. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* **38**:264-270.
85. Inchaurreondo, V., Yantorno, O. y Voget, E., 1993. Yeast Growth and β -galactosidase production During Aerobic batch Cultures in Lactose-Limited Synthetic Medium. *Process Biochemistry.* **29**:47-54.
86. Ingle MR, Erickson RJ (1978) Bacterial alpha-amylases. *Adv. Appl. Microbiol.* **24**: 257-278.
87. Isenschmid, A., Marison, I. y von Stockar, U., 1995. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells. *J. Biotechnol.* **39**:229-237.
88. Jolivet, P., Bergeron, E., Benyair, H. Y Meunier, J., 2001. Characterization of major protein phosphatases from selected species of *Kluyveromyces*. Comparison with protein phosphatases from *Yarrowia lipolytica*. *Can J. Microbiol.* **47**:861-870.

89. Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G. y Vicaria, J., 2004. Kinetic models of activity for β -galactosidase: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme Microbiol. Technol.* **34**:33-40.
90. Khalil, S.J. Filho, F.M., Rodrigues, M.I., 2004. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*. **40**(2):581-586.
91. Krishnamorthy N, Muscato TV, Sniffen CJ, van Soest P., 1982. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. *J. Dairy Sci.* **65**: 217- 223.
92. Ladero, M., Perez, M., Santos, A. y García-Ochoa, F., 2003. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase on sephabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme Microbiol Technol.* **33**:199-205.
93. Ladero, M., Ferrero, R., Vian, A., Santos, A. y García-Ochoa, F., 2005. Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable β -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2. *Enzyme Microbiol Technol.* **37**:505-513.
94. Leclerc, M., Chemardin, P., Arnaud, A., Ratomahenina, R., Galzy, P. Gerbaud, C., Raynal, A. y Guérineau, M., 1987. Comparison of the properties and of the purified β -glucosidase from the transformed strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the donor strain *Kluyveromyces fragilis* Y610. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**:410-422.
95. Leclercq-Peralt, M., Corrieu, G. y Spinnler, H., 2004. Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Sci.* **87**:1545-1550.
96. Leng, R., 1990. Factors affecting the utilisation of “poor-quality” by ruminants, particularly under tropical conditions. *Nutrition Research.* **3**:277-303.
97. Lilly, M., Lambrechts, M. y Pretorius, S., 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:744-753.
98. Lim, J., Yamasaki, Y., Suzuki, Y. y Ozawa, J., 1980. Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **44**:473-480.
99. Love, G., Gough, S., Brady, D., Barron, N., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. y McHale, A., 1998. Continuous ethanol fermentation at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IBM3 immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioproc. Eng.* **18**:187-189.
100. Love, G., Nigam, P., Barron, N., Singh, D., Marchant, R. y McHale, A., 1996. Ethanol production at 45 °C using preparations of *Kluyveromyces marxianus* IBM3 immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioproc. Eng.* **15**:275-277.
101. Lukondeh, T., Ashbolt, N. y Rogers, P., 2005. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**:284-288.
102. Machado, K. y Linardi, U., 1990. Production of amylase and β -galactosidase by yeasts. *Arch. Biol. Technol.* **33**:247-253.
103. Madigan, T. M., Martinko, M. J. y Parker, J., 2004. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 10º Ed. Pearson Educación, S. A. Madrid.
104. Mahoney, R., 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem.* **63**(2):147-154.
105. Mahoney, R., Nickerson, T. y Whitaker, J., 1975. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **58**:1620-1629.

106. Margaritis, A. y Bajpai, P., 1983. Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(2):723-725.
107. Marison, I. y von Stockar, U., 1987. A calorimetric investigation of the aerobic cultivation of *Kluyveromyces fragilis* on various substrates. *Enzyme Microb. Technol.* **9**:33-43.
108. Martín, S. A., and D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct-fed microbial on rumen microbial fermentation. *J. Dairy. Sci.* **75**:1736-1744.
109. Martins, D., de Souza, C., Simoes, D. y de Moraes, M., 2002. The β -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBD 6556 decreases by high concentrations of galactose. *Curr. Microbiol.* **44**:379-382.
110. Marwaha, S y Kennedy, J., 1988. Whey pollution problem and potential utilization. *J. Fd. Sci. Technol.* **23**:323-336.
111. Mazutti M., Ceni, G., Di Luccio, M. y Treichel, H., 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **30**:297-304.
112. Mazutti, M., Bender, J., Treichel, H. y Di Luccio, M., 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microbial Technol.* **39**:56-59.
113. McKenzie, H y Wallace, H., 1954. The Kjeldahl determination of nitrogen: A critical study of diagnostic conditions. *Aust. J. Chem.* **7**:55.
114. Medeiros, A., Pandey, A., Christen, P., Fontoura, P., Freitas, R. y Soccol, C., 2001. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:767-771.
115. Medeiros, A., Pandey, A., Freitas, R., Christen, P. y Soccol, C., 2000. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* **6**:33-39.
116. Mitchell, D., Berovic M. y Krieger N., 2000. Biochemical aspect of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* **68**:65-67.
117. Moreira, A., Philips, J. y Humphrey, A., 1981. Utilization of carbohydrates by *Thermonospora sp.* Grown on glucose, cellobiose and cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1325-1338.
118. Namboothiri, K. y Pandey, A., 1996. Solid-state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium sp.* *Biotechnol. Lett.* **16**(2):199-204.
119. Nava, I., Gaime-Perraud, I., Huerta-Ochoa, S., Favela-Torres, E. y Saucedo-Castañeda, G. 2006. *Penicillium commune* spore production in solid-state fermentation of coffee pulp at laboratory scale and helical ribbons rotating reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1**:1760-1766.
120. Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**:375-381.
121. Newbold, C. J. 1995. Microbial feed additives for ruminants. In: Wallace R. J. and A. C. Chesson. (eds.). *Biotechnology in animal feed and animal feeding*. C V H. Publishers, New York, N. Y. USA. Pp: 259-278.
122. Nigam, P., Banat, I., Singh, D., McHale, A. y Marchant, R., 1997. Continuous ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized on mineral Kissiris at 45 °C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**:283-288.

123. Nilsson, U., Barron, N., McHale, L. y McHale, A., 1995. The effects of phosphoric and pretreatment on conversion of cellulose to ethanol at 45 °C using the yeast strain thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IBM3. *Biotechnol. Lett.* **17**:985-988.
124. Nocek, J., 1988. In situ and others methods to estimate ruminal protein end energy digestibility: a review. *J. Dairy Sci.* **71**(8): 2051-69.
125. Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**:81-84.
126. Pandey, A., Kavita, P. y Selvakumar, P., 1998. Culture conditions for production of 2-1- β -d-fructan-fructano-hydrolase in solid culturing on chicory (*Cichorium intybus*) roots. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **41**(2):231-236.
127. Pandey, A., Soccol, C. Leo, J. y Nigam, P., 2001. Solid-state fermentation in Biotechnology. *Asiatech Publisher, Inc., New delhi.* pp. 221.
128. Pandey, A., Soccol, C. y Mitchell, D., 2000. New developments in solid-state fermentation. 1. Bioprocess and products. *Process Biochem.* **35**(10):1153-1169.
129. Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S., 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. *Biochem. Eng. J.* **6**(2):153-162.
130. Panesar, P., Panesar, R., Singh, R., Kennedy, J. y Kumar, H., 2006. Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J. Chem. Tech. Biotech.* **81**:530-543.
131. Penman, C. y Duffus, J., 1974. Ergosterol is the only sterol in *Kluyveromyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **40**:529-531.
132. Pessela, B., Mateo, A., Vian, A., García, J. y C., Carrascosa, 2003. One step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged β -galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 using novel heterofunctional chelate-epoxy sephabeads. *Biomacromol.* **4**:107-113.
133. Pinos-Rodríguez, J., González, M., Mendoza, M., Bárcena, G. y Cobos, P., 2002. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la digestibilidad in vitro de la pared celular del heno de alfalfa (*Medicago sativa*) o de ballico (*Lolium perenne*). *Interciencia* **27**: 28-32.
134. Queirós, O., Casal, M., Althoff, S., Moradas-ferreira, P. y Leão, C., 1998. Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* mutants deficient in malate transport. *Yeast.* **14**:401-407.
135. Raghavarao, K., Ranganathan, T. y Karanth, N., 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**:127-135.
136. Raimbault, M. y Alazard, D., 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol.* **9**:199-209.
137. Ramírez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernández-Rodríguez, C. y Villa-Tanaca, L., 2004. Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Food Microbiol.* **91**:245-252.
138. Ramírez-Zavala, B., Mercado-Flores, Y., Hernández-Rodríguez, C. y Villa-Tanaca, L., 2004. Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**:369-375.
139. Raynal, A. y Guérineau, M., 1984. Cloning and expression of the structural gene for β -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **195**:108-115.

140. Rech, R., Cassini, C., Secchi, A. y Ayub, M., 1999. Utilization of protein-hydrolyzed chesse whey for the production of b-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**:91-96.
141. Riel., R. 1991. Composición y estructura de la leche. Cap.1. Ciencia y Tecnología de la Leche. Ed. Amiot, J., Edit. Acribia, Zaragoza, España.
142. Rojo, R., 2005. Effects of exogenous amylases from *Bacillus lecheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123-124**: 655-665.
143. Rojo-Rubio, R., Mendoza-Martínez, G., Montañez-Valdez, O., Rebollar-Rebollar, S., Cardoso-Jiménez, D., Hernández-Martínez, D. y González-Razo, F., 2007. Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. *Universidad y Ciencia.* **23** (2):173-182.
144. Rouwenhorts, R., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W. y van Dijken, J., 1990a. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3337-3345.
145. Rouwenhorts, R., Ritmeester, W., Verbakel, J., Scheffers, W. y van Dijken, J., 1990b. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3329-3336.
146. Rouwenhorts, R., Visser, L., van der Baan, A., Scheffers, W. Y van Dijken, J., 1988. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1131-1137.
147. Sánchez, L. y Castillo, J., 1980. Producción, extracción y caracterización parcial de β -D-galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. *Acta Cient. Venez.* **31**:154-159.
148. Sato, T., Nakamura, K. y Sato, S., 1985. Solid-State ethanol fermentation by means of Inert Gas Circulation. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:1312-1319.
149. Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, K., Nvarros, S. y Raimbault, M., 1992. Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of *Schwanniomyces castellii*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**:164-161.
150. Saucedo-Castañeda, G. y Trejo-Hernández, M., 1994. On-line Automated Monitoring and Control systems for CO₂ and O₂ in Aerobic and Anaerobic Solid- State Fermentations. *Process Biochem.* **29**:13-24.
151. Scharpf, L., Seitz, E., Morris, J. y Farbood M., 1986. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. In: Parliament TH, Croteau R (eds) *Biogenesis of aroma*, American Chemical Society, Washington, DC, vol.**317**:322-346.
152. Schmidt, J., Szakacs, G., Cenkvari, E., Sipocs, J., Urbanszki, K. y Tengerdy, R., 2001. Enzyme assisted ensiling of alfalfa with enzymes by solid substrates fermentation. *BioresourceTechnol.* **76**: 207-212.
153. Schneider, A., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M. y Jonas, R., 2001. Oxygen transfer on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. *Biotechnol. Lett.* **23**:547-550.
154. Schwan, R. y Rose, A., 1994. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:62-67.
155. Schwan, R., Cooper, R. y Wheals, A., 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **21**:234-244.
156. Selvakumar, P. y Pandey, A., 1999. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus sp.* and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry.* **34**:851-855.

157. Serrat, M., Bermudez, R. y Villa, T., 2004. Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus* potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **117**:49-64.
158. Stambuk, B., Franden, M., Singh, A. y Zhang, M., 2003. The xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **108**:255-263.
159. Steensma, H., de Jongh, F. y Linnekamp, M., 1988. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeast: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. *Curr. Genet.* **14**:311-317.
160. Sunil, B., Singh, H., Singh, G. y Patil, R., 2008. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. *Indian J. Microbiol.* **48**:337-341.
161. Tanner, R., Souki, N. y Russel, R., 1977. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**:27-42.
162. Tilley, J. y Terry, R., 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassland Soc.* **18**:104-111.
163. Tirado-Estrada, G., Mejía-Haro, I., Cruz-Vázquez, C., Mendoza-Martínez G., Tovar-Luna, I. y Fajardo-Peña, J., 2001. Effects of exogenous enzymes on fiber degradation of corn stalks. *J. Anim. Sci.* **79** (Suppl. 1): 283.
164. Tovar-Castro, L., García-Garibay, M. y Saucedo-Castañeda, G., 2008. Lactase production by *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an inert support: effect on inoculum, buffer and nitrogen source. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **151**:610-617.
165. Toyoda, Y. y Sy, J., 1984. Purification and phosphorylation of fructose-1,6-biphosphatase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Biol. Chem.* **259**:8718-8723.
166. Van den Broek, P., De Bruijne, A. y Van Steveninck, J., 1987. The role of ATP in the control of H⁺-galactosidase symport in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. J.* **242**:729-734.
167. van Dijken, J., Weusthuis, R. y Pronk, J., 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek.* **63**:343-352.
168. Van Soest, P., 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application of forages. *J. Anim. Sci.* **26**:119-128.
169. [Van Soest, P., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd. Ed. Ithaca Cornell University Press. p:476.](#)
170. Visser, W., Scheffers, W., Batenburg-van der Vegte, W. y van Dijken, J., 1990. Oxygen requirements of yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3785-3792.
171. Welsh, F., Murray, W. y Williams, R., 1989. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* **9**:105-169.
172. Wimborne, M. y Rickard, P., 1978. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. *Biotechnol. Bioeng.* **20**:231-242.
173. Workman, W. y Day, D., 1984. The cell wall-associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **50**:349-353.
174. Yoda, K., Ko, J., Nagamatsu, T., Lin, Y., Kaibara, C., Kawada, T., Tomishige, N., Hashimoto, H., Noda, Y. y Yamasaki, M., 2000. Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:142-148.

175. Yoshida, Y., Yokoi, W., Wada, Y., Ohishi, K., Ito, M., Sawada, H., 2004. Potent hypocholesterolemic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 in rats fed a high cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:1185-1192.

ANEXOS

ANEXOS

A-1 MEDIOS DE CULTIVO

Agar Papa Dextrosa (marca BIOXON). Empleado para propagación de *Kluyveromyces marxianus*. (g/L): 39.0.

Tabla 18 A-1 Composición del medio basal

Composición	g/L	Referencia
Lactosa	50	
Extracto Levadura	2.23	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (SA)	8.75	Cortés <i>et al.</i> , 2005; Lukondeh <i>et al.</i> , 2005
KH ₂ PO ₄	2.72	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.518	

Tabla 19 A-2 Medios de cultivo

Medio	Preparación	Modificación	g/L
Medio basal	En amortiguador de acetatos de sodio pH 5.5, 25 mM	-	-
Medio basal	En amortiguador de fosfato de potasio pH 5.5, 25 mM	-	-
Medio basal modificado	En amortiguador de fosfato de potasio pH 5.5, 25 mM	SA, 80 %	7
		Urea (U), 20 %	0.796
		SA, 60 %	5.25
		U, 40 %	1.592
		SA, 40 %	3.5
		U, 60 %	2.388
Medio basal modificado SA:U (80:20)	En amortiguador de fosfato de potasio pH 5.5, 25 mM	SA, 20 %	1.75
		U, 80 %	3.184
		U, 100 %	3.98
Medio basal modificado SA:U (80:20)		Lactosa	100
			150
Medio basal modificado SA:U (80:20)		Todos los nutrientes	2X
			3X
Medio basal modificado SA:U (80:20)	A partir de leche entera Santa Clara	Suero de leche ultrafiltrado por lactosa	48
Medio basal modificado SA:U (80:20)		Suero de leche ultrafiltrado industrial por lactosa	48

A-2 SOLUCIONES

Preparación de ONPG 34 mM. Pesar 0.1025 g de ONPG, disolverlos en 10 mL de amortiguador de KH_2PO_4 (6.8 g/L) y K_2HPO_4 (8.7 g/L) pH 7, 50 mM.

Preparación de reactivos Nelson-Somogyi

Reactivo 1. Mezclar 1 ml de solución B con 25 ml de solución A.

Solución A: (g/L) Na_2CO_3 25; $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25.0; NaHCO_3 20.0 y Na_2SO_4 200.0.

Solución B: (g/200 ml) H_2SO_4 4 gotas disueltas en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30.0 g.

Reactivo 2. Mezclar lentamente las dos soluciones con agitación y aforar a 500 ml. Calentar a 55 °C por 30 min.

Solución A: Disolver en 450 ml de agua destilada: H_2SO_4 concentrado 25 ml; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_2\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 g.

Solución B: Disolver en 25 ml de agua destilada: $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g.

Suero de leche a partir de leche entera Santa Clara

1. Poner la leche en baño María a 37 °C y esperar a que llegue a la temperatura.
2. Por cada litro de leche adicionar 1 ml de cuajo (Qualact).
3. Agitar y dejar calentando a 30 °C por aproximadamente 40-50 min hasta formar un gel firme.
4. Sacar del baño y dejar enfriar.
5. Cortar el gel para separar el suero de los sólidos.

Suero de leche ultrafiltrado. El suero de leche preparado se ultrafiltró en un concentrador (Millipore mod. 8200) de capacidad de 150 mL, con nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 40 mL/min. Se empleó una membrana de filtración de 10, 000 Da.

Preparación de la solución FDN:

a) Pesar y disolver en 2 L de agua destilada el EDTA (335 g) y el Borato de sodio (122.6 g).

- b) Pesar y disolver en 1 L de agua destilada caliente (70°C) el fosfato de sodio monobásico (82.1 g).
- c) Pesar y disolver en 3 L de agua destilada el lauril sulfato sódico (540.0 g).
- d) Incorporar las 3 premezclas en un depósito con capacidad para 18 L.
- e) Agregar 180 ml de etilenglicol a la premezcla.
- f) Aforar con agua destilada hasta 18 L agitando constantemente.

Preparación de la solución FDA 1 % p/v.

A un litro de agua agregar poco a poco 56 mL de ácido sulfúrico concentrado, llevar la solución a un volumen final de 2 L con agua y adicionar 20 g de cetil-trimetil-amonio.

Procedimiento de colecta del líquido ruminal:

Cuando la determinación se realiza temprano por la mañana no será necesario alimentar a los animales, pero si se realiza más tarde, deberá evitarse el acceso de los animales al agua o alimento por tres horas antes del muestreo. Para obtener el líquido se quita la tapa de la cánula ruminal y preferentemente se deja reposar en una cubeta con agua tibia. Manualmente se retira toda la ingesta situada en la parte alta del interior del rumen. A continuación se introduce un vaso Nalgene estéril de 250 ml al interior del rumen, se extrae el líquido ruminal de la parte media o baja del rumen y se deposita en el termo, el cual de preferencia debe quedar lleno para evitar espacios con aire (Castellanos *et al.*, 1990). Finalmente se limpia el exterior de la cánula y nuevamente se coloca la tapa.

Saliva de McDougall:

Bicarbonato de sodio 9.80 g; Fosfato ácido disódico heptahidratado 7.0 g (si es anhidro pesar 3.71 g); Cloruro de potasio 0.57 g; Cloruro de sodio 0.47 g; Sulfato de magnesio heptahidratado 0.12 g; Urea 1 g; Cloruro de calcio 0.04 g. Disolver los primeros cinco reactivos en agua destilada y aforar a un litro; antes de usarlo se adicionan el CaCl₂ y burbujea CO₂ a la solución hasta alcanzar un pH de 6.8 - 7.0.

A-3 PRUEBAS BROMATOLÓGICAS Y DE DIGESTIBILIDAD

La estructura básica de los materiales lingocelulósicos o forrajes toscos, se constituye de microfibrillas de celulosa, de cadenas de hemicelulosa y de lignina que une cadenas de hemicelulosa; entre ambas protegen y encierran a la celulosa. Son materiales que constituyen las paredes celulares lignificadas, que limitan la disponibilidad de los carbohidratos para la alimentación de rumiantes. Existen diversos métodos para tratar estos materiales y mejorar su aprovechamiento; uno de ellos es el tratamiento con vapor a alta presión; el agua a alta temperatura y presión funciona como un ácido que rompe los enlaces ligninocelulosa y solubilizando la hemicelulosa.

A-3.1 PRUEBAS BROMATOLÓGICAS

DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA, DE CENIZAS Y DE PROTEÍNA (%)

La MS (%), cenizas y proteína se determinó de acuerdo a la AOAC (16th ed., 1996). La MS (%) se determinó colocando muestras en estufa con circulación forzada de aire a 55 °C por 48 horas. Posteriormente se enfriaron y pesaron estimando el % MS por diferencia de peso.

Para la determinación de cenizas se pesó 1 g de muestra seca molida, se puso en un crisol tarado, numerado y a peso constante, se calcinó en mufla a 600 °C por 30 minutos, se pone en desecador a enfriar y se vuelve a pesar. Se multiplica el peso de las cenizas encontradas en 1 g de MS por el porcentaje de MS de la muestra.

La proteína se determinó por el método Kjeldahl, el cual se basa en la transformación del nitrógeno contenido en la muestra en sulfato de amonio mediante la digestión con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. El ion amonio obtenido se transforma en medio básico en amoníaco que se destila y valora con una solución de ácido patrón (McKenzie y Wallace, 1954). El procedimiento para la determinación de proteína es el siguiente:

- Pesar 1 g de muestra homogeneizada (m) en un matraz de digestión Kjeldahl.

- Agregar 3 perlas de vidrio, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 0.5 g de sulfato cúprico y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Conectar el matraz a la trampa de absorción que contiene 250 mL de hidróxido de sodio al 15 %. El disco poroso produce la división de los humos en finas burbujas con el fin de facilitar la absorción.
- Los depósitos de sulfito sódico se eliminan con ácido clorhídrico.
- Calentar en manta calefactora y una vez que la solución esté transparente, dejar en ebullición 15 a 20 min más. Si la muestra tiende a formar espuma agregar ácido esteárico o gotas de silicona antiespumante y comenzar el calentamiento lentamente.
- Enfriar y agregar 200 mL de agua. Conectar el matraz al aparato de destilación, agregar lentamente 100 mL de NaOH al 30 % por el embudo y cerrar la llave.
- Destilar no menos de 150 mL en un matraz que lleve sumergido el extremo del refrigerante o tubo colector en: 50 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N, 4 a 5 gotas de rojo de metilo y 50 mL de agua destilada. Asegurar un exceso de H₂SO₄ para que se pueda realizar la retrotitulación. Titular el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta color amarillo o 50 mL de ácido bórico al 3 %. Titular con ácido clorhídrico 0.1 N hasta pH 4.6
- Efectuar un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.

Los cálculos son los siguientes:

$$\% N = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$$
$$\% \text{ Proteína} = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times \text{factor}}{m \times 1000}$$

Donde:

- V : 50 mL H₂SO₄ 0.1 N - gasto NaOH 0.1 N o gasto de HCl 0.1 N
- m : masa de la muestra en gramos
- factor: 6.25: para proteínas en general.

DETERMINACIÓN DE FIBRA DETERGENTE NEUTRO (FDN) Y FIBRA DETERGENTE ÁCIDA (%)

El contenido de los diferentes componentes del material vegetal del rastrojo de sorgo (celulosa, hemicelulosa y lignina) se determinó empleando la metodología de Van Soest (1967, 1994). El material seco se pasó por un molino de cribas (Wiley, mod.4) hasta obtener partículas de 1 mm de diámetro. Las muestras fueron sometidas a tratamiento con las soluciones FDN y FDA (Anexo A-2). El tratamiento con los detergentes consiste en ebullición por 1 h, posteriormente el material se filtra y lava con agua caliente y etanol empleando un crisol Gooch, posteriormente se seca a 90 °C por 24 h y se pesa. Inmediatamente, a las muestras tratadas con los detergentes se les cubre con H₂SO₄ al 76% durante 3 h. El ácido se lava con agua caliente y se deja reposando por 24 h. Se pesan los residuos de cada tratamiento para estimar la composición del rastrojo de sorgo.

El reactivo de fibra detergente neutro permite eliminar todo el material soluble (proteínas, cenizas, grasas, carbohidratos solubles). Después de éste tratamiento sólo queda el material celular compuesto por celulosa, hemicelulosa y lignina, a éste residuo se le llama entonces fibra detergente neutro (FDN). Mientras que el reactivo de fibra detergente ácida solubiliza la hemicelulosa y su residuo será la fibra detergente ácida (FDA) y el tratamiento con H₂SO₄ sólo deja intacta la lignina.

DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA (%)

La materia orgánica (MO), nitrógeno (N), fueron determinados por el método de la AOAC (16th ed., 1996).

A-3.2 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

DETERMINACIÓN DE pH, NITRÓGENO AMONIACAL (NH₃) Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LA MATERIA SECA (DIVMS)

El N total y N amoniacal se cuantificaron mediante las técnicas propuestas por Krishnamorthy *et al.*, 1982. La digestibilidad *in vitro* se midió con la primera fase de la técnica de Tilley y Terry (1963).

El método de digestibilidad *in vitro* consiste en colocar muestras de 0.5 g como sustrato en un tubo equipado con válvulas para el escape de gases, lo cual el sustrato servirá como fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos extraídos del rumen. Sin embargo, es necesario agregar los demás elementos nutritivos para el microorganismo y el medio adecuado que les permita desarrollarse. La saliva de McDougall llena los requisitos de estabilidad de pH y requerimientos minerales de los microorganismos ruminales. El procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera:

- El forraje debe estar en base seca (55 °C) y molidos en un tamiz de 1 mm.
- Pesar 0.5 g de muestra dentro de un tubo de centrifuga numerado. Determinar aparte materia orgánica y humedad.
- Adicionar a cada tubo 50 ml de saliva de McDougall e incubarlos a 39 °C por lo menos 15 min y adicionar 5 ml de líquido ruminal; pasar una corriente de CO₂ dentro del tubo por 15 segundos y tapar inmediatamente.
- Preparar un blanco siguiendo las mismas indicaciones pero sin agregar muestra.
- Es necesaria una agitación suave a las 2, 4, 20 y 28 horas después de iniciada la incubación para dispersar las partículas (de tres a cinco veces al día).
- Después de 48 h, adicionar 1 ml de HCl concentrado y agitar para homogenizar, agregando 1 ml de pepsina al 5%; rotar los tubos e incubar a 39 °C por 48 h (agitando tres veces al día).
- Después de las 48 horas de la digestión con pepsina hay que filtrar (en papel) con el equipo de vacío y enjuagar el tubo y el filtrado con tres porciones de 10 ml de agua fría; secar el papel (o crisol) con la materia insoluble a 105 °C toda la noche, se enfria y pesa.
- Calcinar para determinar materia orgánica, si se desea expresar digestibilidad de materia orgánica.

Cálculos:

$$\% \text{DIVMS} = \frac{\text{MSI} - (\text{MSR} - \text{MSR blanco})}{\text{Materia seca inicial}} \times 100$$

Donde:

DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (%).

MSI: Materia seca inicial.

MSR: Materia seca residual.

MSR: Materia seca residual del blanco.

Para materia orgánica el cálculo es similar, pero utilizando los resultados de la calcinación. La DIVMS es un proceso que debe repetirse al menos dos veces. Los tubos de incubación no constituyen repeticiones sino submuestras, de tal forma que el proceso de incubación se considera como bloque y la información se analiza como un diseño de bloques generalizados al azar donde el error experimental es el bloque tratamiento.

A-3.3 PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD *IN SITU*

DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD, DIGESTIBILIDAD DE FIBRA DETERGENTE NEUTRO Y DIGESTIBILIDAD DE FIBRA DETERGENTE ÁCIDA EN BASE SECA

La técnica de degradabilidad “*in situ*” es una forma de evaluar indirectamente la digestibilidad de los alimentos, siendo una de las mediciones más coincidentes con la realidad, permitiendo estudiar la dinámica de transformación del alimento en el rumen (Nocek, 1988).

Las muestras, antes de ser incubadas en los rumiantes, fueron picadas en partículas de 0,5 cm aproximadamente y colocadas, 20 g/cm², en bolsas de nylon (con 50 μ de porosidad). Se utilizaron cuatro tiempos de incubación, 12, 24, 48 y 72 h. Al final de cada tiempo las bolsas fueron lavadas con agua corriente, hasta que la misma quedo clara, colocadas en estufa de ventilación forzada de aire, a 55°C, por 48 h, luego enfriadas a temperatura ambiente y pesadas, determinándose posteriormente la digestibilidad *in situ* en base seca (%), digestibilidad de la FDN (%). y la FDA (%) (A-2.1.2 y A-2.2.1). La digestibilidad *in situ* se determinó como el porcentaje de desaparición en la bolsa de MS, FDN y FDA. Se emplearon

bovinos canulados en rumen de peso promedio 40 Kg. Los bovinos fueron alimentados con alfalfa fresca (60 %) y ensilado de maíz (40 %). La digestibilidad *in situ* de la materia seca (%DIMS) y la cantidad de FDN digerido se calculan de la siguiente manera:

$$\% DIMS = 100 - [(MSR/MSO) \times 100]$$

Donde: g MSR = Materia seca residual, gramos.

g MSO = Materia seca original, gramos.

$$Dig (\%FDN) = 100 - [(FDNMR/FDNMO) \times 100]$$

donde:

g FDNMR = FDN de la materia residual.

g FDNMO = FDN de la muestra original.

En el análisis estadístico, se utilizó diseño de bloques al azar (Daniel, 2002), tomando como criterio de bloques los días de incubación (tres días). El análisis de varianza se realizó con el programa NCSS y las medias se compararon con la prueba de Tukey.

A- 4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SECCIÓN 6.2

Tabla 20 A.4 a. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* UCDCC 351.

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	dCO ₂ /dt máx	t dCO ₂ /dt máx
100:0	2.9±0.8 ^a	0.2±.001 ^c	0.99	92.4±3.4 ^a	6±0.2 ^a	9.8±0.001 ^a
80:20	3.6±0.1 ^a	0.24±.001 ^b	0.99	95±5.8 ^a	6.7±0.5 ^a	11.7±0.8 ^b
60:40	3.7±0.1 ^a	0.27±.001 ^a	0.98	96±4.6 ^a	6.8±0.3 ^a	12.4±0.01 ^b
40:60	5±0.1 ^b	0.23±.001 ^b	0.99	104.4±2.2 ^a	5.3±0.3 ^b	13.8±0.01 ^c
20:80	6.4±0.1 ^c	0.2±.01 ^c	0.98	96.8±2.5 ^a	5.6±0.1 ^b	13.9±0.01 ^c
0:100	6.4±0.1 ^c	0.17±.001 ^d	0.99	83±6.3 ^a	4.3±0.3 ^c	15.2±0.01 ^d

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
100:0	39.8±0.2 ^d	81.2±1.9 ^b	0.31±0.007 ^c	nd	nd	nd
80:20	47.5±0.4 ^c	81.3±1.4 ^b	0.39±0.01 ^a	24.4±0.02 ^a	nd	49.4±1 ^a
60:40	49.3±0.5 ^b	90.4±0.9 ^a	0.35±0.01 ^b	3.8±0.02 ^b	1.9±0.02 ^b	38.6±0.03 ^b
40:60	51.8±0.2 ^a	89.6±2.5 ^a	0.36±0.02 ^b	nd	3.3±0.02 ^a	nd
20:80	45±1.2 ^d	73±.2.3 ^c	0.41±0.02 ^a	nd	0.8±0.01 ^c	nd
0:100	38.4±1 ^e	57.4±1.2 ^d	0.39±0.01 ^a	nd	nd	nd

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

Tabla 21 A.4 b. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* NCYC 587.

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	dCO ₂ /dt máx	t dCO ₂ /dt máx
100:0	9.9±0.9 ^a	0.26±0.003 ^a	0.99	76.3±6.5 ^a	4.2±0.02 ^a	31.8±3.6 ^a
80:20	9.5±0.1 ^a	0.2±0.02 ^b	0.99	81.8±1.3 ^a	4.2±0.02 ^a	27±3.6 ^a
60:40	9.7±0.01 ^a	0.2±0.002 ^b	0.99	69.1±0.02 ^a	3.8±0.03 ^b	28.2±0.4 ^a
40:60	9.3±0.9 ^a	0.19±0.003 ^c	0.99	57.8±5.4 ^b	3.3±0.01 ^c	27.5±0.1 ^a
20:80	9.5±0.9 ^a	0.19±0.001 ^c	0.98	70.7±5.1 ^a	4.2±0.1 ^a	30±1.8 ^a
0:100	10.3±0.01 ^a	0.16±0.01 ^d	0.96	49.7±5.3 ^c	3.2±0.3 ^c	35.9±1.8 ^a

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
100:0	66.7±10 ^a	93.7±0.2 ^c	0.46±0.001 ^a	2129.3±115 ^a	13.7±0.001 ^b	11.5±0.00 ^c
80:20	69.5±0.5 ^a	94±0.1 ^a	0.48±0.02 ^a	2038.3±47 ^a	15.4±0.001 ^a	23.0±0.1 ^a
60:40	62.8±0.1 ^c	92.5±0.3 ^d	0.42±0.001 ^b	1.5 ^b	19.5±0.001 ^a	22.3±2 ^a
40:60	61.7±0.2 ^c	96.3±0.3 ^a	0.39±0.002 ^c	Nd	8.2±0.001 ^c	8.8±1 ^d
20:80	64±0.1 ^b	95.5±0.4 ^b	0.43±0.002 ^b	Nd	7.3±0.001 ^c	6.9±0.4 ^e
0:100	60.8±0.001 ^d	94.6±0.2 ^c	0.4±0.001 ^c	Nd	2.8±0.001 ^d	16.9±0.5 ^b

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

Tabla 22 A.4 c. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* NCYC 1109.

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	dCO ₂ /dt máx	t dCO ₂ /dt máx
100:0	5.3±0.01 ^a	0.27±0.001 ^a	0.99	65.4±0.6 ^a	5.7±0.1 ^a	14.1±0.01 ^a
80:20	10.5±0.1 ^b	0.2±0.001 ^b	0.98	41.0±2.5 ^b	5.3±0.3 ^a	20.4±0.02 ^b
60:40	10±0.02 ^b	0.19±0.003 ^c	0.96	33.4±1.7 ^d	3.5±0.2 ^c	22.2±0.01 ^d
40:60	10.7±0.4 ^b	0.17±0.004 ^d	0.99	36.2±0.8 ^c	4.5±0.1 ^b	20.6±0.2 ^b
20:80	13.2±0.4 ^c	0.15±0.001 ^e	0.99	26.5±0.7 ^c	3.1±0.1 ^d	21±0.1 ^c
0:100	16.7±1.1 ^d	0.14±0.001 ^f	0.99	18±1.4 ^e	2.3±0.2 ^e	22.2±0.1 ^d

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
100:0	44.7±0.01 ^c	86.9±0.5 ^d	0.30±0.0007 ^a	434.1±10 ^b	nd	nd
80:20	47.3±0.1 ^b	90±0.2 ^c	0.31±0.003 ^a	644.9±7 ^a	nd	10.5±0.1 ^a
60:40	37.4±1 ^d	71.9±3 ^a	0.30±0.013 ^a	21.7±1.7 ^c	nd	nd
40:60	44.8±1 ^c	93±0.4 ^b	0.31±0.001 ^a	Nd	nd	nd
20:80	50.8±1 ^a	94.1±0.01 ^a	0.30±0.001 ^a	Nd	nd	nd
0:100	27±0.01 ^e	55 ±1.9 ^e	0.28±0.01 ^b	Nd	nd	nd

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

Tabla 23 A.4 d. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* NCYC 1429.

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	dCO ₂ /dt máx	t dCO ₂ /dt máx
100:0	6.9±0.7 ^a	0.21±0.02 ^a	0.99	72.8±7.8 ^a	4.2±0.4 ^b	19.4±0.6 ^a
80:20	7.2±1.9 ^a	0.23±0.03 ^a	0.99	80.8±7.8 ^a	5±0.4 ^a	19.5±0.5 ^a
60:40	15.6±0.1 ^b	0.18±0.02 ^b	0.99	77.6±2.6 ^a	4.9±0.1 ^a	27.2±0.1 ^b
0:60	22.1±0.1 ^c	0.17±0.01 ^b	0.98	10.4±1.9 ^b	1.4±0.2 ^c	27±0.1 ^b
20:80	23.5±0.8 ^d	0.17±0.02 ^b	0.99	10.5±2.5 ^b	1±0.04 ^d	28.3±3.6 ^c
0:100	nd	nd	nd	Nd	nd	nd

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
100:0	78.4±0.5 ^a	96 ±0.4 ^b	0.50±0.05 ^a	1194.1±12.4 ^b	3.8±0.02 ^c	nd
80:20	72.5±1.2 ^b	97.2±0.04 ^a	0.45±0.05 ^a	1831.1±15.2 ^a	9.7±0.04 ^b	nd
60:40	60.7±0.7 ^c	97.8±0.04 ^a	0.35±0.006 ^b	762.2±11 ^c	12.5±0. 5 ^a	8.5±0.05 ^a
40:60	46.7±0. 1 ^d	76.8±0.2 ^c	0.31±0.002 ^c	Nd	1.3±0.005 ^d	nd
20:80	29.7±1.4 ^e	69.6±0.1 ^d	0.23±0.001 ^d	Nd	nd	nd
0:100	13.8±1.2 ^f	49.8±0.9 ^e	0.16±0.003 ^e	Nd	nd	nd

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

Tabla 24 A.4 e. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* CDBBL 278.

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	R ²	CO ₂ total formado (mg/g msi)	dCO ₂ /dt máx	t dCO ₂ /dt máx
100:0	12.2±1.1 ^a	0.27±0.001 ^a	0.99	48.2±0.7 ^a	4.2±0.6 ^b	22.5±0.2 ^a
80:20	17.1±1 ^b	0.23±0.001 ^b	0.99	36.7±0.9 ^b	4.7±0.1 ^b	30.2±0.1 ^b
60:40	16.6±0.2 ^b	0.23±0.001 ^b	0.99	48.3±0.3 ^a	5.6±0.04 ^a	29±0.6 ^b
40:60	nd	nd	nd	15.6±9 ^e	nd	nd
20:80	nd	nd	nd	20±0.7 ^c	nd	nd
0:100	nd	nd	nd	9.6±0.2 ^d	nd	nd

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	Y _{x/s} (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
100:0	53.1±5 ^a	82.3±0.5 ^b	0.35±0.004 ^a	659.7±12 ^b	31±0.05 ^b	203.1±1.3 ^b
80:20	42.5±1.2 ^b	85.6±0.02 ^a	0.27±0.001 ^b	1147.7±17 ^a	34.2±0.2 ^a	241.6±0.4 ^a
60:40	51.1±1.4 ^a	77.8±0.2 ^c	0.37±0.006 ^a	344.7±6 ^c	31.8±0.4 ^b	69.2±0.3 ^c
40:60	20.4±0.3 ^d	64.6±3.4 ^e	0.18±0.01 ^c	Nd	20.3±0.03 ^c	10.8±0.00 ^d
20:80	26.4±0.5 ^c	72.3±0.3 ^d	0.19±0.001 ^c	Nd	nd	nd
0:100	21.2±0.4 ^d	62.1±2 ^e	0.20±0.006 ^c	Nd	nd	nd

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

Tabla 25 A.4 f. Efecto del origen de la fuente de nitrógeno en las variables principales del CMS de *K. marxianus* Agua Miel A1.

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Fase de retardo (h)	μ_{CO_2} (h^{-1})	R^2	CO ₂ total formado (mg/g msi)	dCO_2/dt máx	t dCO_2/dt máx
100:0	5.7±0.1 ^a	0.42±0.02 ^a	0.94	42.3±0.5 ^b	3.3±0.04 ^b	10.6±0.2 ^a
80:20	6.4±0.9 ^a	0.42±0.01 ^a	0.94	37.5±0.5 ^c	2.8±0.04 ^c	10.7±0.1 ^a
60:40	5.8±0.2 ^a	0.41±0.01 ^a	0.997	57.1±2.4 ^a	3.6±0.1 ^a	10.8±0.1 ^a
40:60	6.2±0.2 ^a	0.27±0.1 ^b	0.993	55.4±2.3 ^a	3.5±0.1 ^a	15.9±0.1 ^b
20:80	7.3±0.1 ^a	0.24±0.02 ^b	0.992	23±2.5 ^e	1.5±0.03 ^e	16±0.1 ^b
0:100	7.3±0.1 ^a	0.2±0.001 ^c	0.996	34.4±0.6 ^d	1.9±0.04 ^d	18±0.2 ^c

Fuente de Nitrógeno (SA:U)	Biomasa (mg/gms)	Consumo lactosa (%)	$Y_{x/s}$ (mgX/mgS)	Lactasa (UI/gX)	Inulinasa	
					Intracelular (UI/gX)	Extracelular (UI/gX)
100:0	37.5±0.4 ^c	83.3±1.14 ^d	0.25±0.005 ^b	864.5±13 ^b	nd	31.3±0.1 ^a
80:20	33±0.3 ^d	81.7±0.03 ^e	0.22±0.002 ^c	1214.7±15.2 ^a	nd	31.1±0.05 ^a
60:40	29.5±0.04 ^e	94.1±0.01 ^a	0.18±0.002 ^d	285.7±7.3 ^c	nd	19.4±0.2 ^b
40:60	50.2±0.002 ^a	92.5±0.03 ^b	0.31±0.002 ^a	Nd	nd	Nd
20:80	44±0.1 ^b	87.6±0.36 ^c	0.27±0.001 ^b	Nd	nd	Nd
0:100	16.7±0.1 ^f	53.1±0.07 ^f	0.18±0.002 ^d	Nd	nd	Nd

Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$); nd: No detectada

A- 5 BALANCE DE CARBONO

Tabla 26 A-5. Tabla comparativa de los balances de carbono (C) del CMS de *K. marxianus* empleando suero de leche, PUF, bagazo de caña de azúcar y rastrojo de sorgo.

Cepa	Condición	Lactosa (mg/gms)	CO ₂ (mg/gmsi)	X (mg X/gms)	g C/CO ₂	gC _x	Medición de C
NCYC 587	EN LACTOSA, PUF Y COLUMNAS	141.4±1.1	59.4±8 ^a	49.6±3.3	16.2±2.2	14.4±1	54.1±1.4
	EN SUERO FRESCO, PUF Y COLUMNAS	182.4±4.2	40.3±14 ^a	58±1.1	11±3.8	20.2±4 ^a	42.8±2.3 ^a
CDBBL 278	EN LACTOSA, PUF Y COLUMNAS	135±2.1	38.5±1.3 ^a	51.8±0.4	10.5±0.4	19±1.7	54.6±2.1
	EN SUERO FRESCO, PUF Y COLUMNAS	187.7±3.2	39.3±3.2 ^a	60.5±5.7	10.7±1	21.2±1.8	42.6±5.1
NCYC 587	EN SUERO FRESCO, BAG Y CHAROLAS	180	88.9	46.4	24.2	16.2	56.2
CDBBL 278		182	88.4	42.6	24.1	14.9	53.6
	SLUI+SORGO EN COLUMNAS	182	123	40	33.5	14.0	65.3
CDBBL 278	SLUI+SORGO EN CHAROLAS	182	133	54	36.3	18.9	75.8
	SLUI+SORGO EN LISTONES	182	121	35.3	33.0	12.4	62.3

PUF: espuma de poliuretano; SLUI: suero de leche ultrafiltrado industrial. Letras diferentes implican que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$).

A-6 DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* E *IN SITU*

Para el estudio de digestibilidad *in vitro* e *in situ* de la materia seca (DIVMS), se empleó fluido ruminal fresco extraído de una vaca con cánula ruminal y alimentada con alfalfa fresca (60 %) y ensilado de maíz (40 %).

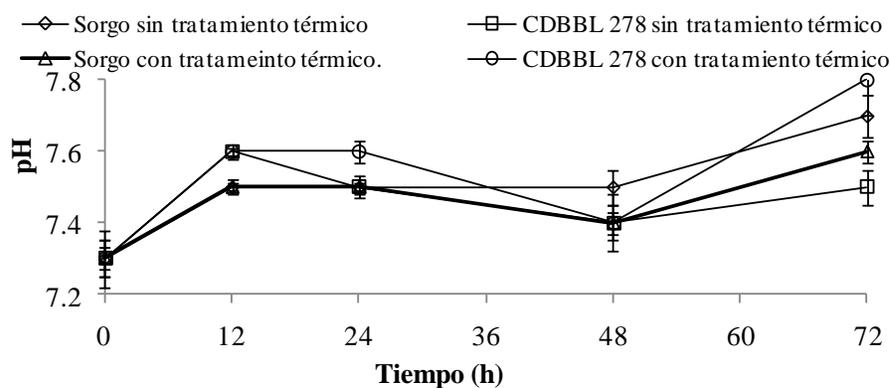


Figura 37 A-6.1. Cinética del pH en los ensayos de la digestibilidad *in vitro* con el control de sorgo y el material fermentado con la cepa CDBBL 278 con los tratamientos de estudio.

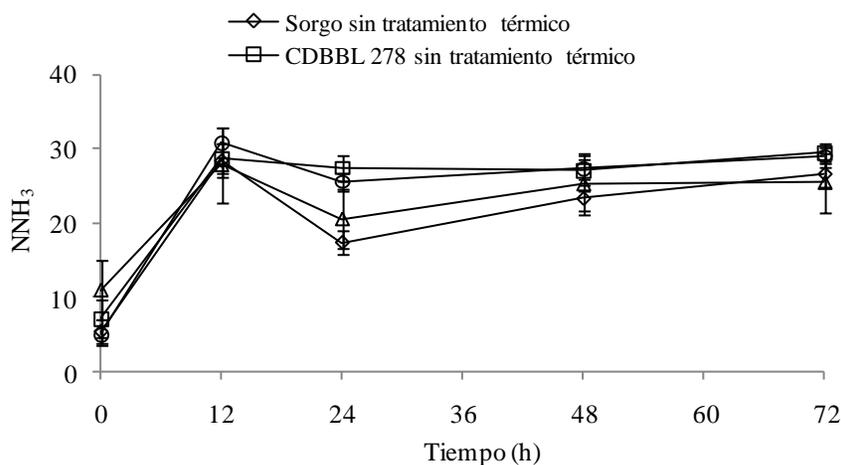


Figura 38 A-6.2. Cinética del nitrógeno amoniacal en los ensayos de la digestibilidad *in vitro* con el control de sorgo y el material fermentado con la cepa CDBBL 278 con los tratamientos de estudio.

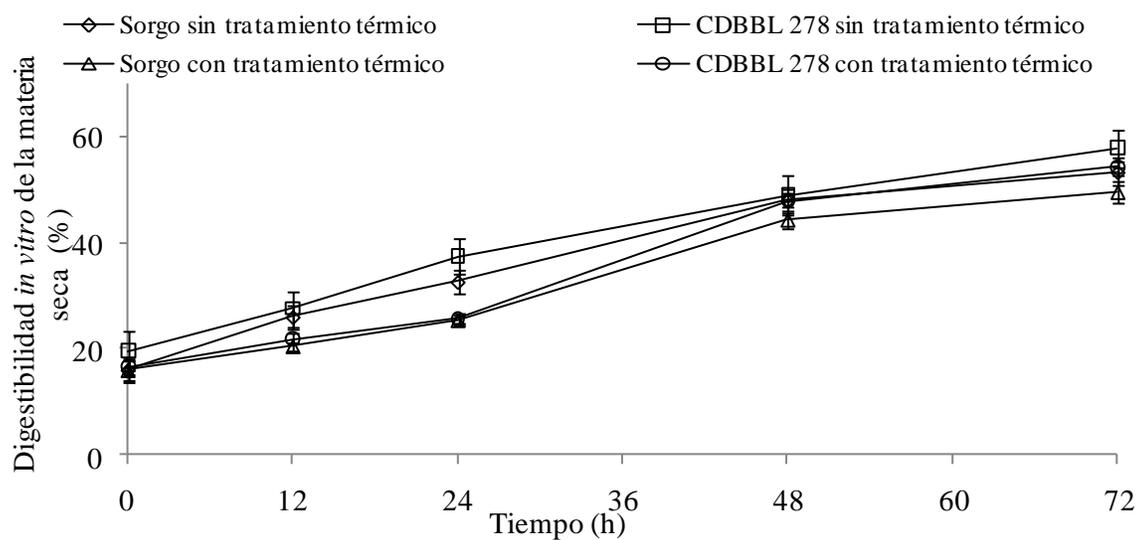


Figura 39 A-6.3. Cinética de la digestibilidad in vitro con el control de sorgo y el material fermentado con la cepa CDBBL 278 con los tratamientos de estudio.

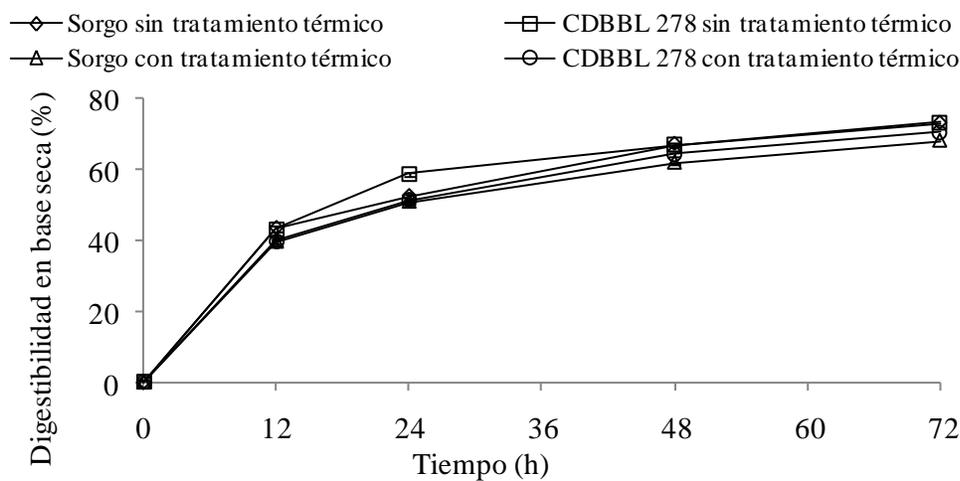


Figura 40 A-6.4. Cinética de la digestibilidad in situ de la materia seca con los tratamientos de estudio.

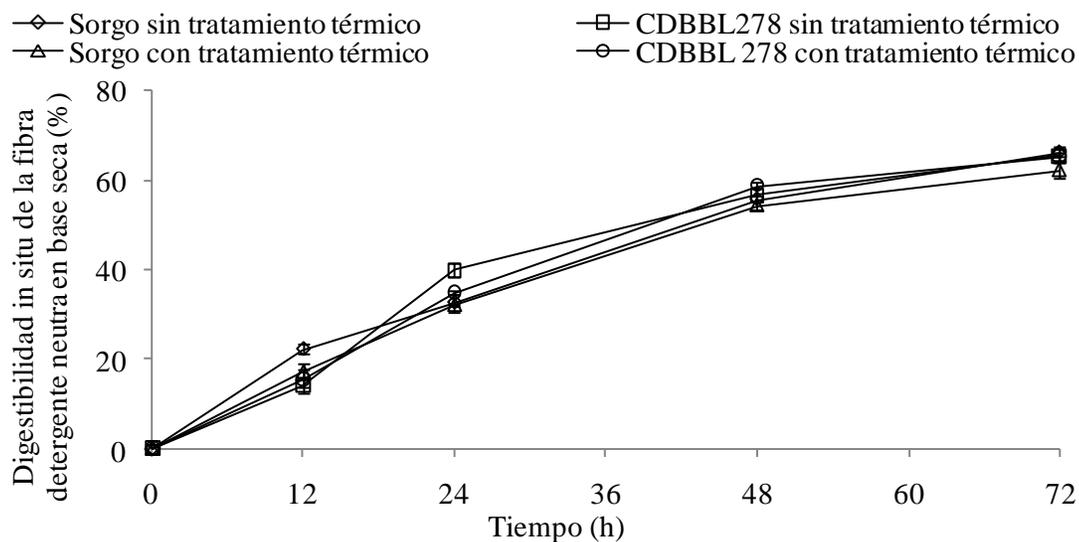


Figura 41 A-6.5. Cinética de digestibilidad in situ de la fibra detergente neutro con los tratamientos de estudio.

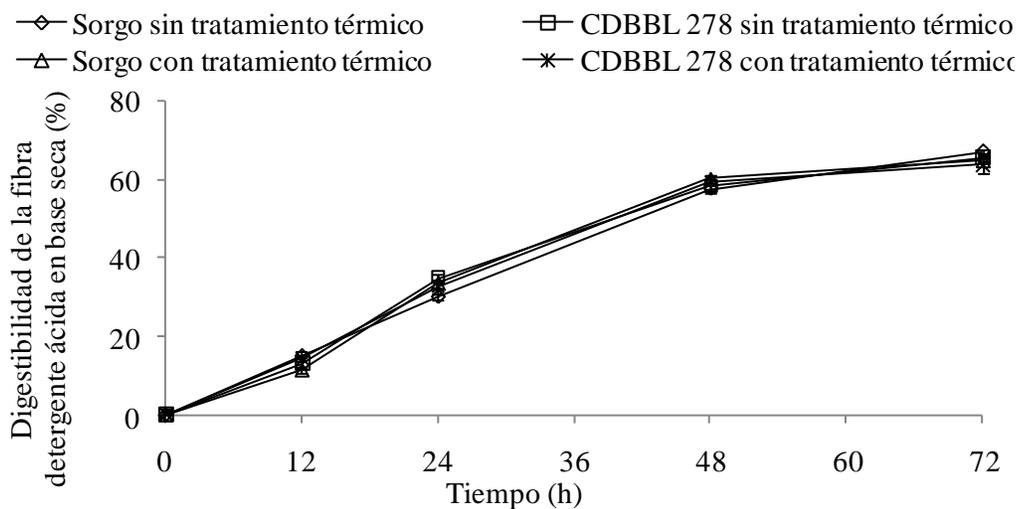


Figura 42 A-6.6. Cinética de digestibilidad in situ de la fibra detergente ácida con los tratamientos de estudio.

A-7 TRABAJOS DERIVADOS DE NUESTROS ESTUDIOS

EFFECTO DE SALES AMORTIGUADORAS DE CAMBIOS DE pH SOBRE EL CULTIVO DE *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 EN FERMENTACION EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Mérida, Yucatán, septiembre de 2005.

EFFECTO DEL NIVEL DE INOCULO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 CULTIVADA EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Mérida, Yucatán, septiembre de 2005.

EFFECTO DEL ORIGEN DE LA FUENTE DE NITROGENO EN EL CULTIVO DE *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Morelia, Michoacán, junio de 2007.

EFFECTO DEL ORIGEN DE LA CONCENTRACION DE LACTOSA EN EL CULTIVO DE DOS CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus* EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Morelia, Michoacán, junio de 2007.

EFFECTO DEL ORIGEN DE LA CONCENTRACION DE NUTRIENTES EN EL CULTIVO DE DOS CEPAS DE *Kluyveromyces marxianus* EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Morelia, Michoacán, junio de 2007.

CULTURE OF *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 IN SOLID STATE CULTIVATION. En la modalidad de cartel. Presentado en The International Conference on New Horizons In Biotechnology & 4th BRSI Convention. Trivandrum, India, Noviembre de 2007.

DIGESTIBILIDAD DE RASTROJO DE SORGO IMPREGNADO CON SUERO DE LECHE Y FERMENTADO EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO POR *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278, en la modalidad de cartel. Presentado en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Acapulco, Guerrero, México, del 21 al 25 de Junio de 2009.

A-8 PUBLICACIÓN A PARTIR DE NUESTRO TRABAJO

Luz Tovar-Castro, Mariano García-Garibay and Gerardo Saucedo-Castañeda, (2008). Lactase Production by Solid-state Cultivation of *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an Inert Support: Effect of Inoculum, Buffer and Nitrogen Source. *Appl Biochem Biotechnol.* **151**:610-617.