

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**APROVECHAMIENTO DE LA FERMENTACIÓN DE LACTOSUERO
PARA LA PRODUCCIÓN DE 2 -FENILETANOL MEDIANTE
*KLUVEYROMICES MARXIANUS***

TESIS

**PARA OBTENER LA ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA**

IA. ANGELICA JUÁREZ GARCÍA

Dirección

Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

Asesor

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Lector

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Enero, 2023

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
1 INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Microorganismos encargados de la producción de 2-FE.....	7
2.2 Levaduras.....	7
2.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	8
2.4 Síntesis Bioquímica.....	8
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO GENERAL	12
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
7. METODOLOGÍA.....	13
7.2 Material biológico	13
7.3 Sustrato para fermentación.....	13
7.4 Fermentación de lactosuero	13
7.5 Optimización.....	14
7.6 Técnicas analíticas.....	15
7.6.1 Determinación de Biomasa.....	15
7.6.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	15
7.6.3 Cromografía de Gases.....	16
7.6.4 Carbono orgánico total	17
7.6.5 Análisis estadístico	18
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
8.1 Remoción de DQO.....	19
8.2 Producción de 2-Feniletanol.....	21
8.3 Optimización de la fermentación de lactosuero.....	22

8.3.1 Fermentación a las 24 horas.	23
8.3.2 Fermentación a las 48 horas.	27
8.3.3 Fermentación a las 72 horas.	31
8.4 Validación de los valores optimizados.	35
9. CONCLUSIONES.....	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de calibración de DQO	16
Figura 2. Curva de calibración de 2-feniletanol (2-FE) por cromatografía de gases	17
Figura 3. Cinéticas de disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) durante 48 h de fermentación.....	20
Figura 4. Porcentajes de remoción de demanda química de oxígeno.....	20
Figura 5. Perfil de producción de 2-FE bajo diferentes concentraciones de precursor y sal de amonio	21
Figura 6. Concentraciones máximas de 2-FE obtenidas mediante fermentación de lactosuero dulce	22
Figura 7. Superficie de respuesta de la producción de 2-feniletanol durante las primeras 24 h de fermentación de lactosuero dulce con <i>K. marxianus</i>	25
Figura 8. Superficie de respuesta de la remoción de COT a las 24 h.	27
Figura 9. Superficie de respuesta de la fermentación de lactosuero dulce con <i>K. marxianus</i> a las 48 horas.	29
Figura 10. Superficie de respuesta de la remoción de COT a las 48 horas.	31
Figura 11. Superficie de respuesta de la fermentación de lactosuero dulce con <i>K. marxianus</i> a las 72 horas.	33
Figura 12. Superficie de respuesta de la remoción de COT a las 72 horas.	34
Figura 13. Comparación de medias entre los tratamientos respecto al tiempo para la validación.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes del lactosuero.	10
Tabla 2. Diseño factorial para evaluar el efecto de la concentración de L-fenilalanina y de sulfato de amonio.	14
Tabla 3. Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para carbono orgánico total e inorgánico, para la pendiente (M), ordenada al origen (B) y coeficiente de correlación (R).....	18
Tabla 4. Tratamientos planteados en el diseño Box-Benken para optimizar la producción de 2-Feniletanol durante la fermentación de lactosuero.....	23
Tabla 5. Análisis de Varianza del modelo cuadrático de producción de 2-FE a las 24 h de fermentación.	24
Tabla 6. Análisis de Varianza de la cinética de remoción de COT a las 24 h de fermentación.	26
Tabla 7. Análisis de Varianza del modelo cuadrático de producción de 2-FE a las 48 h de fermentación	28
Tabla 8. Análisis de Varianza del modelo de remoción de COT a las 48 h de fermentación.	30
Tabla 9. Análisis de Varianza del modelo cuadrático de producción de 2-FE a las 72 horas de fermentación.....	31
Tabla 10. Análisis de Varianza del modelo de remoción de COT a las 72 horas de fermentación	33
Tabla 11. Condiciones de experimentos para la validación de los modelos a los tres tiempos.....	35

1 INTRODUCCIÓN

El 2-feniletanol (2-FE) es un alcohol superior ampliamente utilizado en las industrias de repostería y de perfumería para imprimir notas florales semejante a rosas. Su principal fuente de obtención es a través de la extracción de flores y de plantas. Además, se han implementado metodologías para su obtención por síntesis química, sin embargo, esto genera grandes cantidades de residuos tóxicos no biodegradables. La síntesis biogénica de estos compuestos es una alternativa para su producción, utilizando la capacidad de *Kluyveromyces marxianus*; para sintetizarlo a través de la fermentación del lactosuero. Debido a la gran cantidad de carbono (lactosa) presente en el suero de leche, este líquido, que es un residuo de la industria láctea, podría ser un soporte para llevar a cabo una fermentación sumergida. Estudios han revelado la eficiencia en la producción del 2-feniletanol (2-FE) bajo estas condiciones, la cual se ve beneficiada por la presencia de algunos aminoácidos aromáticos en especial la L-fenilalanina en combinación con el sulfato de amonio. Es así como el presente estudio pretende determinar las mejores combinaciones de tiempo y las concentraciones de L-fenilalanina y de sulfato de amonio para la máxima obtención de 2-FE durante la fermentación del lactosuero por *K. marxianus* mediante un diseño Box-Benken.

Por otro lado, la mayoría de los productos procesados generan gran variedad de contaminantes, dichos residuos pueden tener un destino final en el aire, en el suelo o el agua, en donde pueden tener un impacto ambiental adverso, causando diversos daños. En cuanto a la industria de productos lácteos; en la producción de productos procesados, es un riesgo que pueda generar aguas residuales contaminadas debido a la presencia del lactosuero. Este tipo de efluente es definido por Siso [1], como el líquido resultante de la precipitación y separación de la caseína de la leche en el proceso de elaboración de quesos. Es importante mencionar que la NOM-002-SEMARNAT-1996 y CONAGUA 2016 [57], establecen los límites máximos permisibles de contaminantes para las descargas de aguas residuales, entre estos, destacan los niveles de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y de Carbono Orgánico Total (COT), que sirven de base para establecer con ello la calidad del agua presente en los efluentes.

2. ANTECEDENTES

Actualmente, hay un interés en la generación de aromas producidos de forma biogénica. Uno de los compuestos más representativos es el 2-feniletanol (2-FE) [2], el cual es definido como un alcohol superior (AS) [3], que posee aroma a rosas. El 2-FE también es conocido por distintos nombres tales como: 2-alcohol fenil etílico, β -alcohol fenil etílico, bencil carbonilo y β -hidroxi etil benceno [4]. The Flavor and Extract Manufacturers Association of United States (FEMA) clasifica al 2-FE como Seguro para consumo humano o GRAS (Generally Recognized as Safe). Este alcohol presenta una gran demanda a nivel industrial, debido a que es considerado como la segunda sustancia más empleada en la industria de perfumería. Sin embargo, no solo es utilizado en este tipo de industrias, sino que es aprovechado en las industrias alimentaria, farmacéutica y química.

El 2-FE es un compuesto con alto valor agregado, ya que su precio puede alcanzar hasta los 1000 dólares/kg y su producción mundial es de aproximadamente 10,000 toneladas por año, por lo que es considerado un componente de explotación industrial [5]. En la industria alimentaria tiene aplicación como aditivo y como aromatizante, usado en bajas concentraciones y libre de compuestos tóxicos en diversos tipos de alimentos. En la industria farmacéutica es utilizado como anestésico local, antiséptico, solvente, repelente para mosquitos y es utilizado por sus propiedades fungicidas. En la industria química es utilizado principalmente como precursor para la obtención de otros compuestos de interés como estireno, éster fenilacético, fenilacetaldehído, ácido benzoico, fenilacético y bifenil éter, entre otros. Además, en la industria de cosméticos y de jabones se aprovecha su estabilidad en medios alcalinos, lo que permite su uso en la fabricación de perfumes y esencias [6].

Hoy en día, la sociedad se ha interesado por consumir productos o compuestos naturales y la Biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que nos ofrece una alternativa para la producción de compuestos que cumplan con las demandas de los consumidores [7]. En cuanto a las empresas dedicadas a la industria de quesos, estas son responsables de generar este residuo, no cumplen con dichas normas, debido a que existe poco conocimiento de este tipo de normas, sin embargo, la falta de interés por parte de los

productores en nuestro país, por tratar sus residuos o bien, otorgarles un valor agregado a estos, ha originado que grupos de investigación busquen diferentes alternativas para aprovechar este contaminante: como la generación de aromas, producción de lactosuero en polvo y otros.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration) y la legislación Europea, han decidido clasificar a los productos obtenidos de forma biotecnológica, como naturales [8], siempre y cuando, cumplan con una característica en general: el sustrato utilizado para la producción, debe ser de origen natural. Por otra parte, la transformación microbiana, nos ofrece grandes oportunidades para la obtención de compuestos, dado que no generan grandes cantidades de subproductos que puedan afectar la calidad final [5]. Estudios recientes han centrado sus investigaciones en encontrar un precursor para beneficiar la producción del 2-FE, siendo la L-fenilalanina el precursor más adecuado [5, 6, 8]. Gracias a la adición de este precursor, es que hoy en día, hay una producción a gran escala de 2-FE, la transformación se puede cumplir, teniendo un costo de producción menor, además de cumplir con la demanda de los consumidores al obtener productos naturales [4].

2.1 Microorganismos encargados de la producción de 2-FE

El manipular microorganismos para la obtención de aromas, de forma natural, es hoy en día, un tema que ha despertado el interés de los investigadores. El 2-FE es considerado un metabolito que se obtiene en el proceso de fermentación [4], sin embargo, los microorganismos implicados en la síntesis de este compuesto son las levaduras, gracias a su maquinaria enzimática.

2.2 Levaduras

Durante el proceso fermentativo, las levaduras producen metabolitos como alcoholes superiores [9]. Las especies más utilizadas para la producción de 2-FE, empleando como precursor la L-fenilalanina, son *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*, ambas especies tienen la capacidad de producir grandes cantidades del compuesto [10].

2.3 *Kluyveromyces marxianus*

Es una levadura que crece en una temperatura máxima de 45 °C, pero su intervalo de crecimiento va desde 25 a 45 °C, cuya temperatura óptima es 37 °C, mientras que su tiempo de generación es de 0.75^{-1} h [11]. Otra característica para resaltar de este ascomiceto es su capacidad de crecer en sustratos que posean diferentes fuentes de carbono como lactosa, galactosa, sacarosa y rafinosa, además de poseer una alta conversión de sustrato a biomasa [12]. No obstante, *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*), es considerada como termotolerante, posee una alta tasa de crecimiento, sin embargo, si se encuentra en un medio con exceso de azúcar, disminuirá su capacidad de desarrollo, crece en un rango de pH de 4.5-7 [13, 14]. Por otra parte, es considerada como facultativa, aunque es importante considerar que no es capaz de crecer bajo condiciones estrictas de anaerobiosis [15, 16, 17, 13]. Sin embargo, la formación del producto (2-FE) se encuentra directamente relacionada con el crecimiento de la levadura.

2.4 Síntesis Bioquímica

K. marxianus, es capaz de producir 2-FE durante su crecimiento, sin embargo, para que esto suceda, es necesario conocer las rutas metabólicas implicadas, para lograr la obtención del producto final. Las rutas son: glucólisis, vía pentosas-fosfato, vía prefanato (vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos), vía de Ehrlich (producción de 2-FE y 2-fenilacetato), además de rutas catabólicas como: cinamato de L-fenilalanina, carboxilación del piruvato y por último, las vías de producción de glicerol, etanol y acetato [10].

En 1970, el médico y bacteriólogo Alemán Paul Ehrlich, realizó estudios, para demostrar que algunos alcoholes superiores, eran capaces de ser degradados por la vía metabólica de los aminoácidos, con la ayuda de un mecanismo, el cual consta de una serie de reacciones de desaminación, descarboxilación y reducción o deshidrogenación. Los productos finales, requieren de precursores durante la fermentación y los aminoácidos cumplen con esa función, es decir, que se tiene una relación entre composición de los aminoácidos y los alcoholes superiores resultantes de la fermentación [4].

En la ruta de Ehrlich, se llevan a cabo diversas reacciones, en primera estancia, la L-

fenilalanina pasa por una reacción de transaminación (liberación de amoníaco) en forma de fenilpiruvato, posteriormente sufre una descarboxilación a fenilacetaldehído, el cual es reducido finalmente a 2-FE [4, 18, 19]. Gracias a esta vía, es que la levadura lleva a cabo la bioconversión de L-fenilalanina a 2-FE.

Cabe destacar la participación de diferentes enzimas en las reacciones, por ejemplo, durante la reducción, actúa la enzima alcohol deshidrogenasa, ayudando a la formación de alcohol feniletílico [20]. La adición de L-fenilalanina, beneficia a las reacciones, para que estas se lleven a cabo de forma más rápida y se produzcan altas concentraciones de productos. La ruta de Ehrlich y la formación de 2-FE, se ven afectadas por la disposición de diferentes nutrientes, por la temperatura y por la cepa de levadura que se utiliza en la bioconversión [4]. Por otro lado, producir el aroma de esta manera impacta en los bajos costos de producción, haciendo el proceso aún más atractivo para ser considerado como un bioproceso natural [21]. La lactosa es el principal componente del lactosuero y su aprovechamiento, como un medio de cultivo, para la producción del 2-FE, es hoy en día una realidad [22].

Lactosuero

El lactosuero, conocido también como el suero de la leche, es un subproducto, que resulta de la elaboración de quesos, se obtiene durante el proceso de cuajada de la leche, es decir, después de la coagulación de las caseínas, formándose un precipitado (cuajada) [23]. Durante la producción de 1 kg de queso, se generan aproximadamente 9 L de lactosuero [14]. Los principales productores de lactosuero a nivel mundial son Europa (86.27 millones de toneladas) y Estados Unidos (48.05 millones de toneladas) [24]. En México, la producción es menor que en los países antes mencionados, con aproximadamente 1 millón de toneladas por año [25]. En el estado de Hidalgo, existen industrias dedicadas a la producción de lácteos, sin embargo, la gran mayoría, utilizan sistemas rudimentarios en los que se desecha este subproducto [26]. Si se considera que la producción de queso, aumenta anualmente en el orden del 2%, esto trae como consecuencia mayor generación de lactosuero. Aunque aproximadamente el 50% del mismo es transformado en diferentes productos de valor agregado (suero en polvo, proteína, biocombustibles, biopolímeros, productos lácteos, aromas, etc.), existe un gran

volumen de este subproducto que es desechado, provocando problemas ambientales [27, 28, 29, 30, 22]).

Composición de Lactosuero

La generación de productos de valor agregado radica en la composición del lactosuero (Tabla 1) [29].

Tabla 1. Principales componentes del lactosuero.

Componente	Porcentaje (%)
Agua	93-94
Lactosa	4.5-6.0
Proteínas	0.6- 1.1
Minerales	0.8- 1.0
Ácido láctico	0.5- 0.9
Grasas	0.06- 0.5

Clasificación de Lactosuero

El lactosuero se clasifica en “dulce” y “ácido”. El lactosuero dulce es resultado de la elaboración de queso, empleando enzimas proteolíticas o cuajo. Estas tienen un efecto sobre las caseínas presentes en la leche, ocasionando que se fragmenten y aglutinen, produciendo una precipitación. Las condiciones a las cuales se lleva a cabo este proceso oscilan en un rango de temperatura entre 15 y 50 °C y un pH ligeramente ácido [31]. Mientras que el lactosuero ácido, se produce por la precipitación ácida de la caseína, a valores de pH de 4.5 o 4.6. [32].

Consideraciones en el Impacto Ambiental y en la Valorización del Lactosuero

De acuerdo con Cervantes y col. [26], se estima que se generan 492,030 L/día de lactosuero en el Valle de Tulancingo, Hidalgo, de los cuales, solo el 28% es empleado como alimento para animales y el 72% restante, es vertido a cuerpos receptores de agua o terrenos de cultivo, ocasionando un impacto negativo en el ecosistema de la región. La

presencia de este desecho favoreció la contaminación del agua, alterando el pH, además del alto contenido de nutrientes que poseen estos residuos [26].

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) del lactosuero oscila entre 50 y 80 g/L como límite máximo, estos valores se atribuyen, principalmente, al contenido de lactosa, ya que es el componente mayoritario en el residuo. [33, 34, 35, 28, 36, 37]. En este sentido, de acuerdo con la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua (CONAGUA, 2016) [57], el lactosuero se clasifica como una *descarga preponderadamente biodegradable*, ya que entra en residuos de industrias alimentarias, en esta Ley se establece el límite máximo de DQO para descargar al alcantarillado, el cual es de 3000 mg/L, no obstante, en dicha legislación, se menciona que se debe *disminuir la concentración del contaminante antes de su descarga, en caso de no cumplir con el límite permisible*.

Por otro lado, las empresas dedicadas a la producción de quesos son responsables de generar este residuo y no suelen cumplir con la legislación, principalmente por desconocimiento de este tipo de leyes y por el descuido de las autoridades. Estas situaciones han fomentado el interés por parte de grupos de investigación para buscar diferentes alternativas para aprovechar este contaminante. Los productos que se pueden obtener a partir del lactosuero son: lactosuero en polvo, producción de aromas, entre otros. En la actualidad, la biotecnología ofrece la alternativa de aprovechar el residuo para la generación de aromas, destacando la producción del 2-FE, tal como lo reportan Conde y col. [22].

3. JUSTIFICACIÓN

K. marxianus es un microorganismo que posee capacidades metabólicas para la producción del 2-FE, utilizando lactosa como fuente de carbono, en la fermentación del lactosuero, adicionando como precursor L-fenilalanina y sulfato de sodio, para la obtención del aroma. Sin embargo, la producción de este metabolito no ha sido optimizada, bajo condiciones de un sustrato complejo como lo es el lactosuero. Adicionalmente, se desconocen las condiciones bajo las cuales *K. marxianus* puede maximizar la producción del 2-FE, minimizando al mismo tiempo la carga orgánica residual del lactosuero. Puesto que este último, a pesar de tener múltiples aplicaciones

industriales, aun es el principal contaminante que produce la industria quesera en México. Por tal motivo, es necesario utilizar herramientas estadísticas de optimización que permitan determinar las mejores condiciones de cultivo; como es la metodología de superficie de respuesta; técnica que permite establecer la influencia de los factores más representativos, así como también las interacciones que influyen en la respuesta y en base a ello incrementar la productividad del proceso de fermentación.

4. HIPÓTESIS

Mediante técnicas de optimización de las concentraciones iniciales de L-fenilalanina y sulfato de amonio en un proceso fermentativo se logrará producir la máxima concentración de 2-feniletanol, maximizando así, también la remoción de la carga orgánica residual.

5. OBJETIVO GENERAL

- Optimizar la producción de 2-FE en la fermentación del lactosuero dulce con *K. marxianus*, aplicando la metodología de superficie de respuesta, empleando como precursores L-fenilalanina y sulfato de amonio.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las concentraciones de L-fenilalanina y de sulfato de amonio que lleven a la mayor producción de 2-FE y la mayor remoción de carga orgánica residual de lactosuero, mediante un diseño factorial exploratorio.
- Optimizar la máxima producción de 2-FE, en función de la concentración de L-fenilalanina y de sulfato de amonio, durante la fermentación del lactosuero dulce empleando *K. marxianus* empleando un diseño Box-Benken.

7. METODOLOGÍA

7.2 Material biológico

La cepa de *K. marxianus* fue proporcionada por el Dr. Páez Lerma del Instituto Tecnológico de Durango, la cual fue aislada durante el proceso de fermentación alcohólica del *Agave duranguensis* para la obtención de mezcal en el Estado de Durango. La levadura se propagó en placas con medio PDA (39 g/L) (Bioxon, México), que fueron incubadas a 28 °C por 24 h, posteriormente fue almacenada a 4 °C, hasta su uso. El inóculo para cultivos posteriores con lactosuero se propagó en un medio LPY (80 g/L de lactosa; Tecsiquim, México), 40 g/L de peptona de caseína (Bioxon, México) y 20 g/L de extracto de levadura (MCD LAB, México) a pH 4.8, incubado a 28 °C bajo agitación (120 rpm) por 24 h.

7.3 Sustrato para fermentación

El lactosuero dulce fue donado por la productora de quesos PROUNILAC de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Tulancingo, Hidalgo). Este fue recolectado inmediatamente después de la producción diaria de queso panela, pasteurizado a 63 °C por 30 min, ajustando el pH a 4.8 con una solución de ácido sulfúrico (1 N). El lactosuero pasteurizado se almacenó a -20 °C en contenedores de 20 L de polietileno, hasta su posterior uso.

7.4 Fermentación de lactosuero

Para encontrar las condiciones de producción de 2-FE se empleó un diseño factorial exploratorio (Tabla 2), estos resultados fueron empleado en un diseño posterior. Se planteó con el software Design-Expert versión 13 (Stat-ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) y sus valores propuestos se muestran en la Tabla 2. Las variables independientes fueron la concentración de L-fenilalanina (1 a 5 g/L) y de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.3 a 1.5 g/L). Las concentraciones del precursor y de la sal se plantearon de acuerdo con un estudio previo reportado por Conde y col. [22]. Las variables respuesta fueron la concentración de 2-FE producido y la reducción en DQO. Para llevar a cabo el experimento se procedió a activar

la cepa de *K. marxianus*, posteriormente se inoculó una concentración de 1×10^6 células/mL en lactosuero dulce, que contenía diferentes concentraciones de los precursores de acuerdo con el diseño estadístico.

Tabla 2. Diseño factorial para evaluar el efecto de la concentración de L-fenilalanina y de sulfato de amonio.

Pozos	Letra asignada por tratamiento	Concentración de L-fenilalanina (g/L)	Concentración de sulfato de amonio (g/L)
A1, B1, C1	T1	3.00	0.90
A2, B2, C2	T2	1.00	0.90
A3, B3, C3	T3	5.00	0.90
A4, B4, C4	T4	3.00	1.50
A5, B5, C5	T5	3.00	0.30
A6, B6, C6	T6	2.00	1.20
D1, D2, D3	T7	4.00	1.20

Para el cultivo, se utilizaron microreactores de placa de 24 pozos (Pall-Corporation) en concordancia con el procedimiento propuesto por Ramírez-Vargas y col. [38]. A cada pozo se le añadieron, en el siguiente orden: lactosuero crudo (1700 μ L), L-fenilalanina (100 μ L) y sulfato de amonio (100 μ L) de acuerdo al diseño planteado. Por último, se inoculó con la levadura (100 μ L), para tener en cada pozo un volumen final de trabajo de 2 mL. Las placas se incubaron a 28 °C y 120 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 h, se centrifugaron a 15000 rpm por 10 min y se filtró el sobrenadante empleando una membrana de 0.45 μ M. Por último, las alícuotas se almacenaron en tubos Eppendorf estériles a -4 °C. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos en este experimento sirvieron como base para plantear el Diseño Box-Benken para la optimización de la producción del 2-FE.

7.5 Optimización

La optimización de la fermentación se realizó empleando un diseño Box-Benken mediante la metodología de superficie de respuesta, utilizando mínimos cuadrados con el software

Design Expert 11.1 (Stat-Ease, Inc. 1300 Godward Street Northeast Suite 6400 Minneapolis). La función objetivo fue un modelo de segundo orden (ecuación 1) [11, 15].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j \\ i < j}} \beta_{i,j} X_i X_j + \varepsilon \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

Y = Variable respuesta.

X_i y *X_j* = Variables independientes.

β₀ = Coeficiente de intersección.

β_i = Coeficiente lineal.

β_{ii} = Coeficiente cuadrático.

β_{ij} = Coeficiente de interacción.

ε = Error experimental aleatorio.

Se validó el modelo en los tiempos seleccionados realizando una comparación de medias empleando el mismo software anteriormente mencionado.

7.6 Técnicas analíticas

7.6.1 Determinación de Biomasa

La determinación de biomasa se realizó por la técnica de conteo de células bajo microscopio, utilizando la cámara de Neubauer.

7.6.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

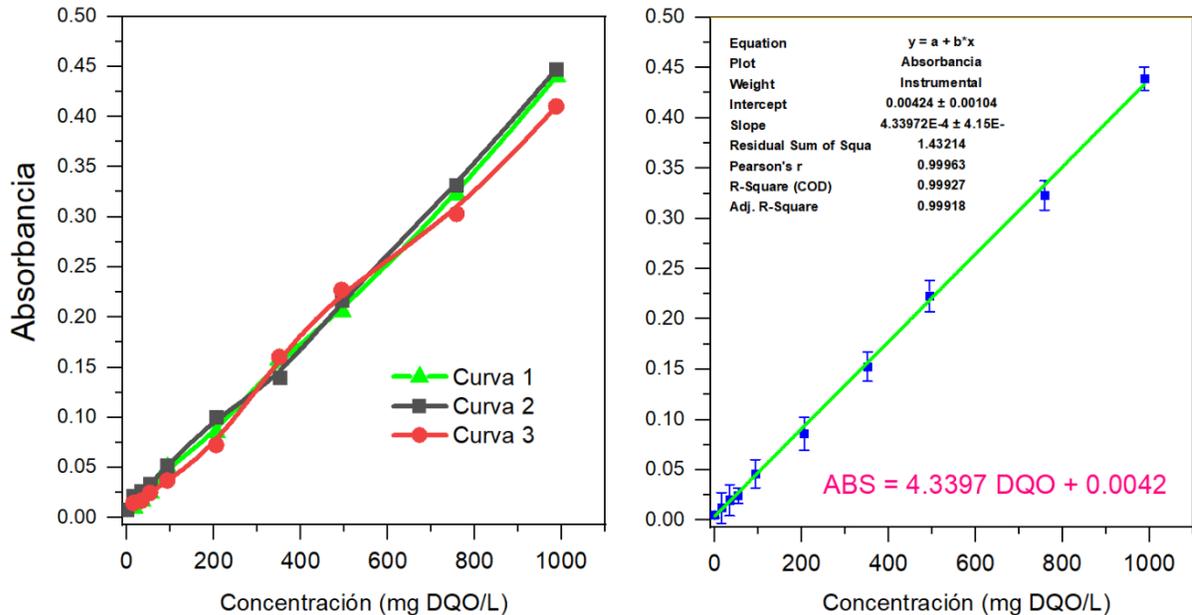
Se utilizó el método normalizado 973.46 E de la AOAC [39]. Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro modelo BioMate 3S (Thermo Scientific) a 600 nm. Para determinar la concentración de DQO se obtuvo una curva de calibración (Figura 1) utilizando como estándar biftalato de potasio (Fermont, ≥99.95%), donde la concentración de DQO se expresó en mg de O₂/mL. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. El cálculo de la eficiencia de remoción de DQO se hizo con la siguiente ecuación:

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

Donde:

E = eficiencia de remoción del sistema (%).

S = carga contaminante de salida (mg O₂/L DQO).



S_o = Carga contaminante de entrada (mg O₂/L DQO).

Figura 1. Curva de calibración de DQO

7.6.3 Cromografía de Gases

Para determinar el contenido de 2-FE se empleó el método reportado por Conde y col. [22], empleando un cromatógrafo de gases Thermo Fisher Scientific (Modelo, Trance 1310) equipado con un detector de Ionización de Flama (FID) y una columna DB WAX J&W Scientifics (60 m x 0.25 mm x 0.25 μm), fijándose las temperaturas del inyector y del detector en 250 y 300 °C, respectivamente. El horno se operó con una rampa de temperatura de 35 a 210 °C, con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min por 4 min. Se utilizó un flujo de nitrógeno como gas acarreador de 1 mL/min, con un volumen de inyección de muestras de 5 μL. Para la identificación se obtuvo una curva de calibración

(Figura 2) con un estándar de 2-FE (Sigma-Aldrich, $\geq 99.0\%$ (GC)). Cada inyección se realizó por triplicado.

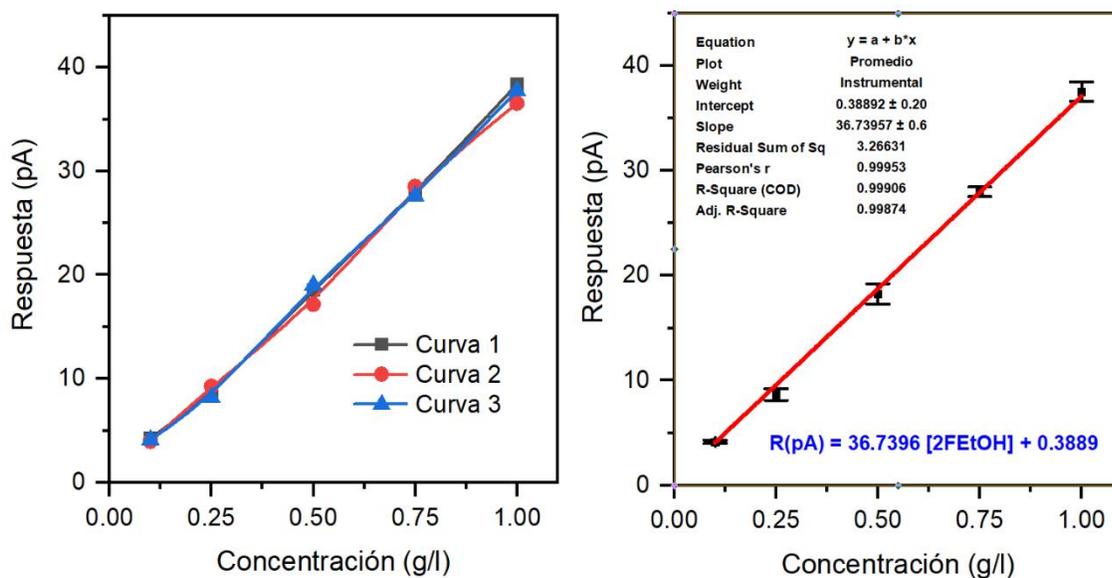


Figura 2. Curva de calibración de 2-feniletanol (2-FE) por cromatografía de gases

7.6.4 Carbono orgánico total

El carbono orgánico, así como el inorgánico, se cuantificaron en un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-5000). Este equipo cuenta con un tubo de combustión para carbono que opera a una temperatura de 680 °C. Se utilizó oxígeno de alta pureza como fase móvil. El volumen empleado de cada muestra fue de 10 mL. Los gases producidos durante la combustión de la muestra fueron registrados por un detector infrarrojo sensible a CO₂, dando un área que es proporcional a la concentración en carbono que contiene la muestra.

Preparación de las muestras para el análisis de carbón orgánico total (TOC): 10 mL de muestra se sometieron a centrifugación a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtró con una membrana de nylon de 0.45 μ m. Se hicieron las diluciones necesarias en agua desionizada (MilliQ 8.1). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para determinaciones posteriores fue necesario preparar una curva de calibración, la cual se obtuvo con diferentes concentraciones de carbono orgánico e inorgánico. El carbono

orgánico residual se determinó restando las concentraciones de carbono inorgánico de las muestras a las lecturas de carbono total (Tabla 3).

Tabla 3. Estimadores de los componentes de las curvas de calibración para carbono orgánico total e inorgánico, para la pendiente (M), ordenada al origen (B) y coeficiente de correlación (R).

	Carbono Total			Carbono inorgánico		
	M	B	R	M	B	R
Curva 1	74.0	157.6	0.99	34.0	153.6	0.99
Curva 2	73.9	158.9	0.99	33.9	156.1	0.99
Curva 3	74.2	156.5	0.99	34.1	149.9	0.99
Media	74.0	157.7	0.99	34.0	153.2	0.99

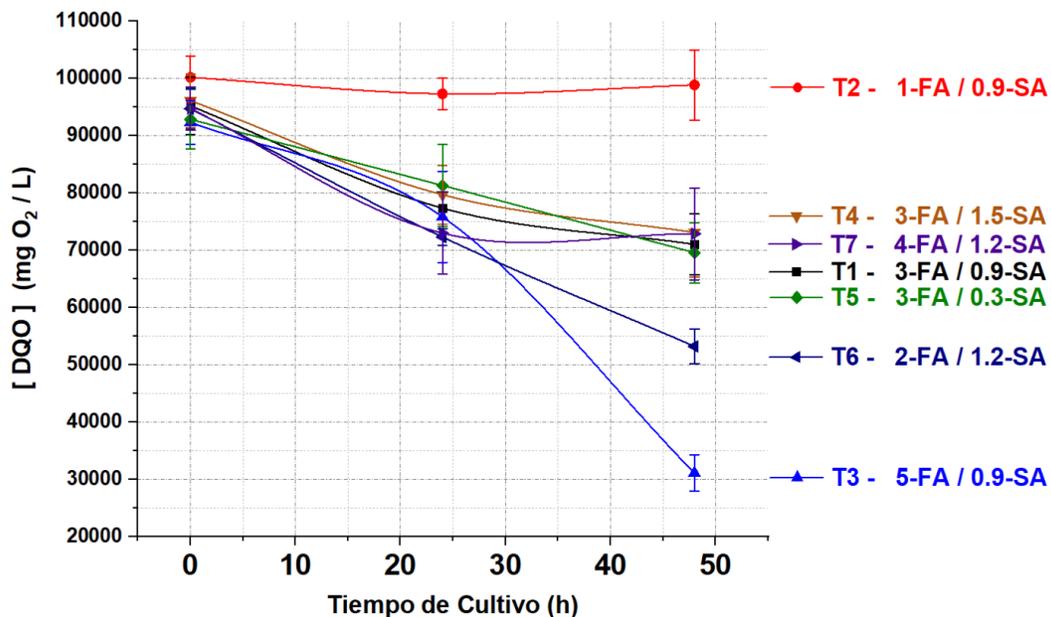
7.6.5 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la concentración de L-fenilalanina y de la sal, a los datos obtenidos de la fermentación que se corrieron de acuerdo al diseño estadístico Box-Benken, se les aplicó un análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias (límite de confianza de 95 %) con la prueba de Tukey-Kramer. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software NCSS Versión 12.0.2 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, ncss.com/software/ncss).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Remoción de DQO

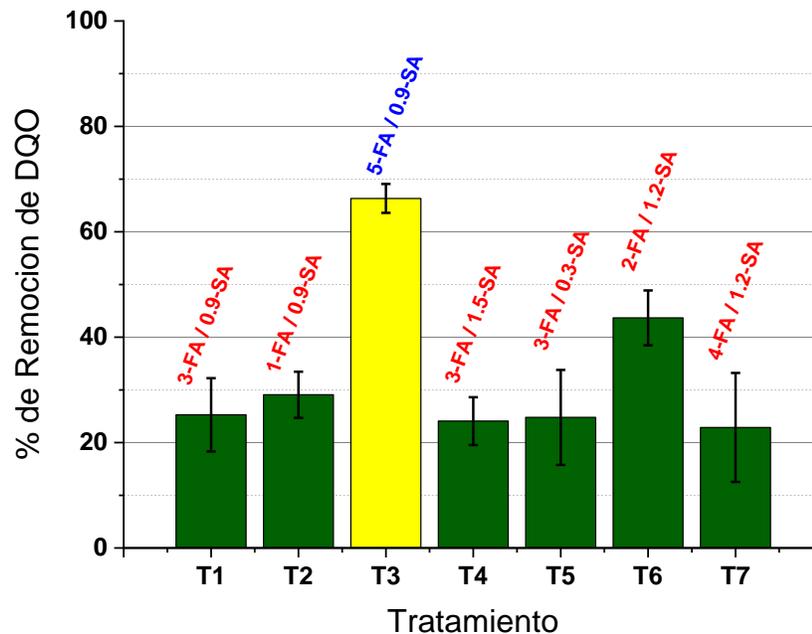
Los datos revelan que el contenido de materia orgánica presente en el lactosuero dulce, supera el límite permisible para su descarga a cuerpos de agua ($> 90,000 \text{ mg O}_2/\text{L}$). Esto lo convierte en un importante contaminante ambiental si no se trata adecuadamente. Es por esto que se deben buscar alternativas de aprovechamiento del mismo que generen valor agregado, haciendo atractivo su tratamiento como residuo antes de desecharlo. En la Figura 3 se muestran los perfiles de reducción de DQO durante el proceso de fermentación, donde se observa que el tratamiento que registro la mayor remoción fue el T3 que contenía 5 g/L de L-fenilalanina y 0.9 g/L de sulfato de amonio. El tratamiento que no registro una reducción significativa fue el T2. Conforme a la tendencia de los perfiles de consumo, incrementos en la concentración inicial de L-fenilalanina parecen favorecer la disminución de los valores de DQO, mientras que la presencia de sulfato de amonio pareciera tener el efecto contrario. Las concentraciones de 3 y 4 g/L de L-fenilalanina



inicial no muestran diferencias significativas en las concentraciones finales obtenidas de DQO.

Figura 3. Cinéticas de disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) durante 48 h de fermentación.

Los porcentajes de remoción calculados (Figura 4), muestran que el mayor porcentaje se obtuvo con el tratamiento T3 con un 66%, seguido del T7 con un 44%. El análisis de comparación de medias (Tukey-Kramer) mostró que T3 no solo tuvo el mayor porcentaje de remoción (Figura 3), sino que fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$. IC 95%) de todos los demás tratamientos. El tratamiento 6 también mostró diferencias significativas ($p < 0.05$. IC 95%) con respecto a los demás, mientras que los otros tratamientos no mostraron



diferencias estadísticamente significativas entre si.

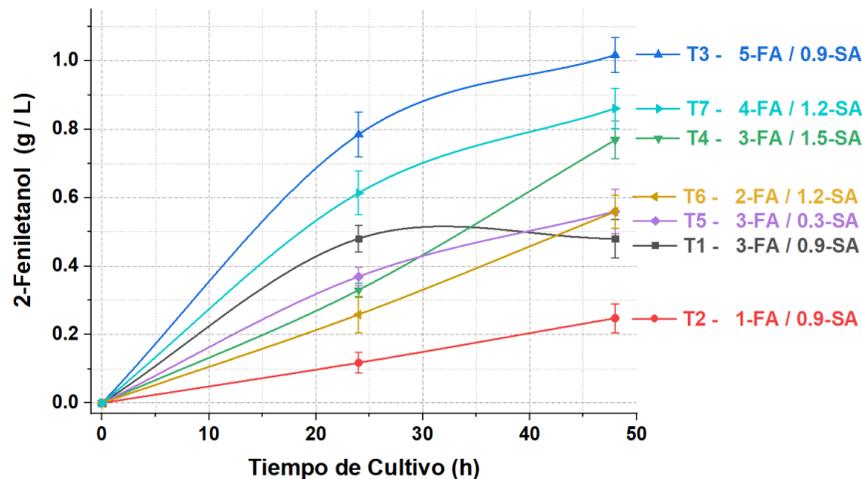
Figura 4. Porcentajes de remoción de demanda química de oxígeno

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que las mejores condiciones para disminuir la DQO del lactosuero, a las 48 h de fermentación, fueron 5.0 g/L de fenilalanina y 0.90 g/L de sulfato de amonio. Estudios publicados por Murari y col. [40], mencionan que, durante la fase exponencial, las levaduras consumen la lactosa, dando lugar a la formación de ácidos orgánicos. Posteriormente en la fase estacionaria, los

microorganismos pueden utilizar estos ácidos, como una medida para mantener su metabolismo celular y por consecuencia, contribuyen a la reducción de la DQO [41, 42].

8.2 Producción de 2-Feniletanol

La Figura 5 muestra los perfiles de producción de 2-FE en un periodo de cultivo de 48 h, donde el T3 (5 g de L-fenilalanina y 0.9 g de sulfato de amonio), fue el tratamiento donde se obtuvo la mayor concentración de 2-FE, que fue de 1.02 ± 0.05 g/L. Los perfiles muestran que desde las 24 h hay diferencias importantes en la producción con respecto a



los demás tratamientos.

Figura 5. Perfil de producción de 2-FE bajo diferentes concentraciones de precursor y sal de amonio

La comparación de medias mostró que en el T3 se obtuvo la mayor producción de 2-FE y que este fue diferente estadísticamente de todos los otros tratamientos, de igual forma se observó que los tratamientos T4 y T7 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 6). Mientras que los tratamientos T1, T5 y T6 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$, IC 95%). Por último, el tratamiento que mostró el desempeño más bajo fue el T2, el cual tenía la concentración más baja de L-fenilalanina ensayada y significativamente diferente a las demás.

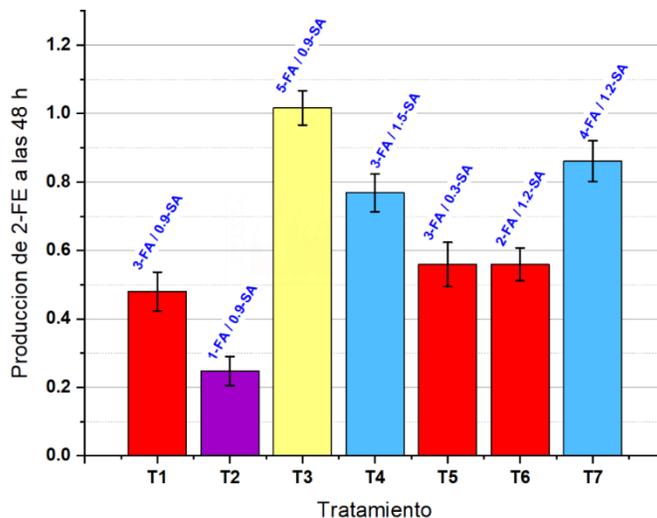


Figura 6. Concentraciones máximas de 2-FE obtenidas mediante fermentación de lactosuero dulce

La diferencia máxima observada en la producción del 2-FE entre los tratamientos; es presumiblemente atribuible a la cantidad de precursor empleado, esto concuerda con lo reportado por Bell y Henschke [43], quienes mencionan que la formación de alcoholes superiores, como el 2-FE, se ve influenciado por el tipo de precursor (aminoácido) empleado y por su concentración, debido a que dependen directamente del metabolismo de los aminoácidos [44]. Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables a los reportados por Conde y col. [22], que obtuvieron una concentración máxima del metabolito de 0.96 ± 0.008 g/L en 48 h, con una concentración de 5 g/L de L-fenilalanina. Lo cual también concuerda con Bell y Henschke [43].

8.3 Optimización de la fermentación de lactosuero

Para optimizar la máxima producción de 2-feniletanol (2-FE) en conjunto con la remoción de la carga orgánica de lactosuero dulce, se planteó un diseño Box-Benken en el programa Design Expert Versión 11.0, ensayando concentraciones de L-fenilalanina de 2 a 6 g/L y de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0.5 a 1.0 g/L. Se obtuvieron 27 tratamientos (Tabla 4). Las corridas se evaluaron a las 24, 48 y 72 h. Como variables de respuesta se tuvo la producción de 2-FE y el porcentaje de remoción de carbono orgánico total (%COD).

Tabla 4. Tratamientos planteados en el diseño Box-Benken para optimizar la producción de 2-Feniletanol durante la fermentación de lactosuero

<i>STD</i>	<i>Corrida</i>	<i>L-Fenilalanina (g/L)</i>	<i>(NH₄)₂SO₄</i>
1	18	2	0.5
2	11	2	0.5
3	14	2	0.5
4	5	6	0.5
5	15	6	0.5
6	2	6	0.5
7	19	2	1
8	4	2	1
9	27	2	1
10	12	6	1
11	21	6	1
12	24	6	1
13	16	2	0.75
14	3	2	0.75
15	7	2	0.75
16	25	6	0.75
17	9	6	0.75
18	17	6	0.75
19	8	4	0.5
20	6	4	0.5
21	23	4	0.5
22	13	4	1
23	22	4	1
24	20	4	1
25	10	4	0.75
26	26	4	0.75
27	1	4	0.75

La concentración de carbono orgánico total (COT) encontrada en el lactosuero crudo al inició del experimento fue de 36,050 mg de COT/L, que convertido a valores de DQO [45], dio una concentración de 107,796.75 mg DQO/L.

8.3.1 Fermentación a las 24 horas.

A las 24 h de fermentación, se realizó un Análisis de Varianza de la producción del 2-FE, a un límite de confianza de 95%, los resultados se muestran en la Tabla 5. Además, se obtuvo un modelo de la variación observada para cada uno de los tiempos. El modelo que se obtuvo a las 24 h (Ec. 2) de fermentación, resulto ser significativo de acuerdo al análisis estadístico (Tabla 5), es fácil visualizar que la concentración de L-fenilalanina es la variable independiente que tiene mayor efecto en el modelo, este resultado confirma lo

propuesto por Eshkol y col. [46], quienes concluyen que una alta concentración de L-fenilalanina, favorecerá la vía de Ehrlich, esta ruta es considerada como la encargada de producir una mayor concentración del metabolito, siempre y cuando se vea inducida [6].

Tabla 5. Análisis de Varianza del modelo cuadrático de producción de 2-FE a las 24 h de fermentación.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	Valor F	*p
Modelo	12.24	5	2.45	9.79	< 0.0001
Fenilalanina (L-FA)	0.1842	1	0.1842	0.7368	0.04004
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0341	1	0.0341	0.1365	0.7155
Interacción L-FA/(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0114	1	0.0114	0.0457	0.8328
(L-FA) ²	2.94	1	2.94	11.77	0.0025
((NH ₄) ₂ SO ₄) ²	9.07	1	9.07	36.26	< 0.0001
Residuales	5.25	21	0.25		
Falta de ajuste	5.14	3	1.71	2.9	0.7560
Error puro	0.1142	18	0.0063		
TOTAL	17.49	26			

SC: suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *p: significancia estadística

Se obtuvieron los coeficientes para el modelo cuadrático que a continuación se presentan.

$$2FE = 1.15 + 0.1012 (LFA) + 0.0435 ((NH_4)_2SO_4) + 0.0309 (LFA * (NH_4)_2SO_4) - 0.7005(LFA)^2 + 1.23 ((NH_4)_2SO_4)^2 \dots\dots\dots Ecuación 2$$

El valor F del modelo de 9.79 implica que el modelo es significativo. Solo hay una probabilidad del 0.01% de que se produzca un valor F tan grande debido al ruido.

Los valores **p** inferiores a 0.05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso los términos **LFA**, **LFA²** y **(NH₄)₂SO₄²** son los que presentaron significancia estadística en el modelo. El valor F de falta de ajuste de 2.90 implica que la falta de ajuste no es significativa. Solo hay una probabilidad del 0.01% de que se produzca un valor F de falta de ajuste tan grande debido al ruido. Por lo anterior el modelo se ajusta al comportamiento observado de los datos experimentales.

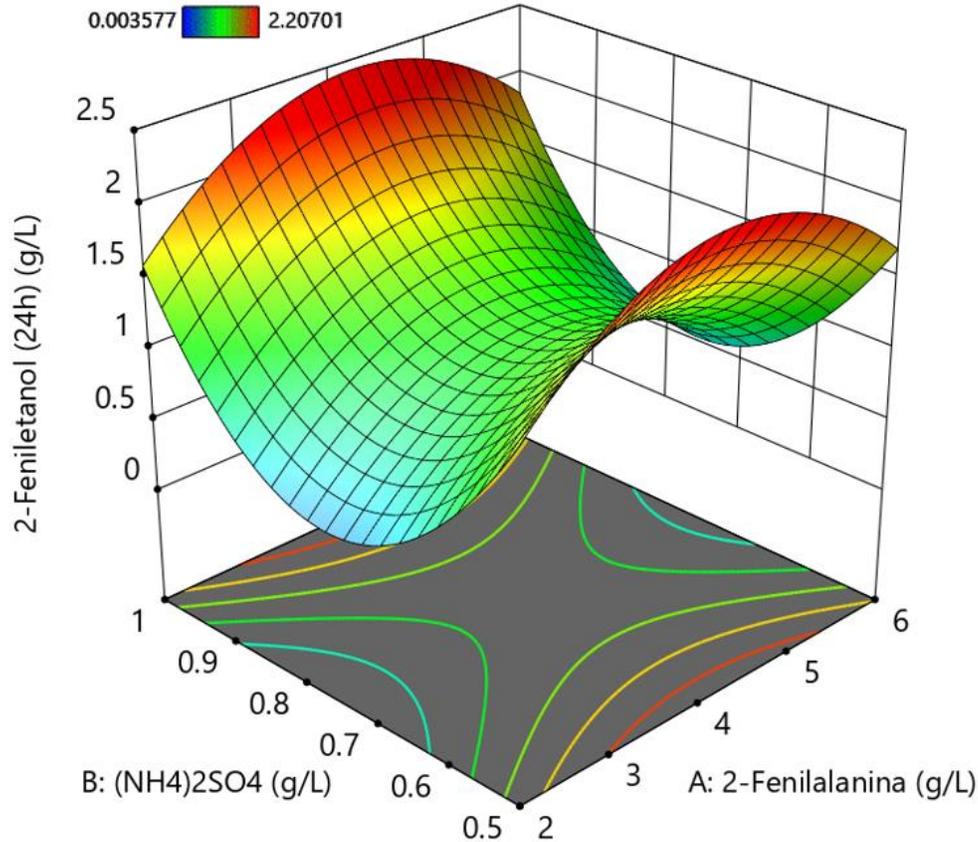


Figura 7. Superficie de respuesta de la producción de 2-feniletanol durante las primeras 24 h de fermentación de lactosuero dulce con *K. marxianus*.

En la Figura 7 se presenta la superficie de respuesta que representa la producción del 2-FE, que se ajustó a un modelo cuadrático, debido a la forma cóncava se podría deducir que aún podrían encontrarse zonas en las cuales se incrementará la producción de este metabolito principalmente al incrementarse (>1 g/L) o disminuirse (<0.5 g/L) la concentración de la sal de amonio, ya que, de acuerdo con lo estipulado por Montgomery [47], este tipo de gráficos sirven para guiar en dirección a la región óptima. El R^2 de ajuste previsto de 0.5340 está razonablemente de acuerdo con el R^2 ajustado de 0.6283; es decir, la diferencia debe ser inferior a 0.2. Una adecuada precisión es la relación señal/ruido que es deseable que sea superior a 4. Para esta variable la relación obtenida fue de 8.800 lo que indica una señal adecuada. Todo lo anterior permite asegurar que el modelo de producción de 2-FE a las 24 h de fermentación se puede utilizar para navegar

por el espacio de diseño.

Con respecto a la disminución del COT, se realizó el análisis de varianza correspondiente, en función de las condiciones antes descritas (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de Varianza de la cinética de remoción de COT a las 24 h de fermentación.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	Valor F	*p
Modelo	301.19	5	60.24	24.32	< 0.0001
Fenilalanina (L-FA)	276.49	1	276.49	111.63	< 0.0001
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.11	1	2.11	0.8515	0.3666
Interacción L-FA/(NH ₄) ₂ SO ₄	2	1	2	0.8063	0.3794
(L-FA) ²	7.1	1	7.1	2.87	0.1051
((NH ₄) ₂ SO ₄) ²	13.48	1	13.48	5.44	0.0297
Residuales	52.01	21	2.48		
Falta de ajuste	14.58	3	4.86	2.34	0.1080
Error puro	37.44	18	2.08		
TOTAL	353.2	26			

SC: suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *p: significancia estadística

Del análisis, se obtuvo el modelo que se muestra a continuación.

$$\%COT = 42.8 - 3.92 (LFA) + 0.3423 ((NH_4)_2SO_4) + 0.4079 (LFA * (NH_4)_2SO_4) - 1.09 (LFA)^2 - 1.50 ((NH_4)_2SO_4)^2 \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$

El modelo resultó ser significativo, en el valor F de los residuales se obtuvo 2.34, lo que implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Existe una probabilidad del 10.80% de que se produzca un valor F de falta de ajuste de este tamaño debido al ruido. La falta de ajuste no significativa es buena, ya que el modelo se ajusta a explicar el comportamiento de remoción de COT observado. Siendo de nuevo el término lineal del precursor (**LFA**) en conjunto con el término cuadrático de la sal ((NH₄)₂SO₄)², los términos más significativos del modelo. Los valores de ajuste del modelo fueron R²= 0.7639 y R² ajustada= 0.8177, ambos valores concuerdan. Por lo cual el modelo puede ser utilizado para navegar dentro del espacio del DCC a las 24 h. A continuación se muestra la superficie de respuesta que se obtuvo de este experimento (Figura 8).

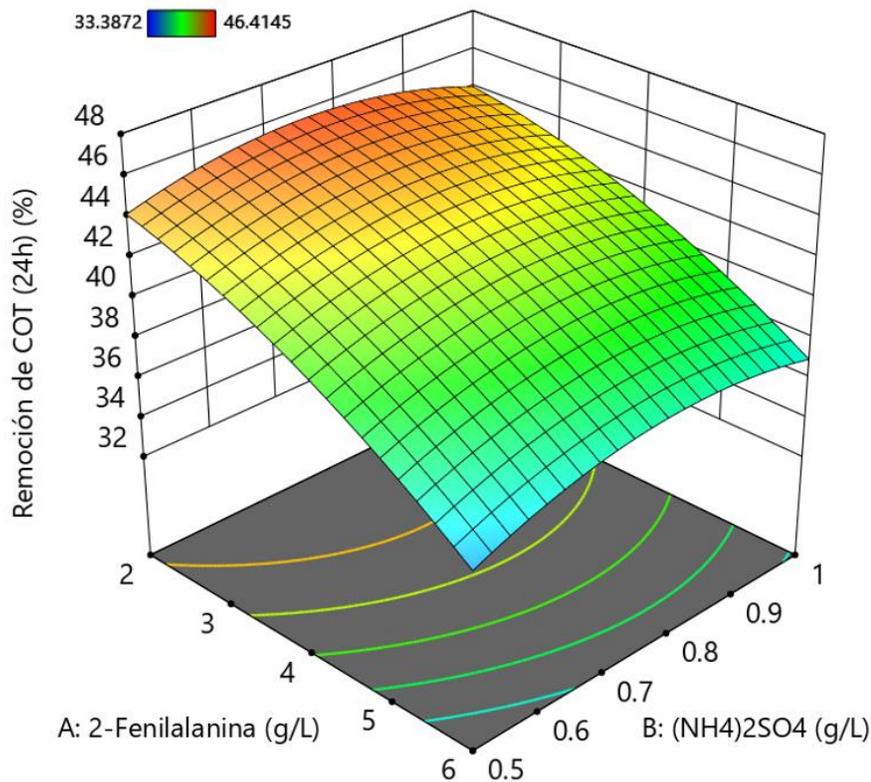


Figura 8. Superficie de respuesta de la remoción de COT a las 24 h.

Para evaluar la remoción de la materia orgánica en los tratamientos aplicados, en primera instancia, se identificaron las condiciones de los tratamientos que permitieron una mayor producción de 2-FE. Para las 24 h de fermentación, las condiciones de mayor producción de 2-FE se dieron a los 4.00 g/L de LFE y 1.0 o 0.5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 8). Una vez seleccionado este parámetro, se buscó su similitud con alguno de los tratamientos aplicados. La mayor remoción obtenida fue del 41% del COT, lo que correspondería en DQO a una remoción de 44% de DQO. Conde-Báez y col. [22], obtuvieron un valor de 51% en el mismo tiempo, la diferencia entre las eficiencias probablemente radica en la composición del lactosuero, ya que en el presente trabajo se empleó una menor cantidad de sal y de precursor.

8.3.2 Fermentación a las 48 h.

Continuando con el proceso de fermentación, de igual forma se analizaron los datos a las 48 h, obteniendo los siguientes resultados del ANOVA (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de Varianza del modelo cuadrático de producción de 2-FE a las 48 h de fermentación

Fuente de Variación	SC	GL	CM	Valor F	*p
Modelo	0.5206	5	0.1041	4.67	0.0051
Fenilalanina (L-FA)	0.121	1	0.121	5.42	0.0299
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0118	1	0.0118	0.5305	0.4744
Interacción L-FA/(NH ₄) ₂ SO ₄	0.002	1	0.002	0.0915	0.7653
(L-FA) ²	0.1603	1	0.1603	7.18	0.014
((NH ₄) ₂ SO ₄) ²	0.2254	1	0.2254	10.1	0.0045
Residuales	0.4687	21	0.0223		
Falta de ajuste	0.2403	3	0.0801	3.31	0.4135
Error puro	0.2284	18	0.0127		
TOTAL	0.9893	26			

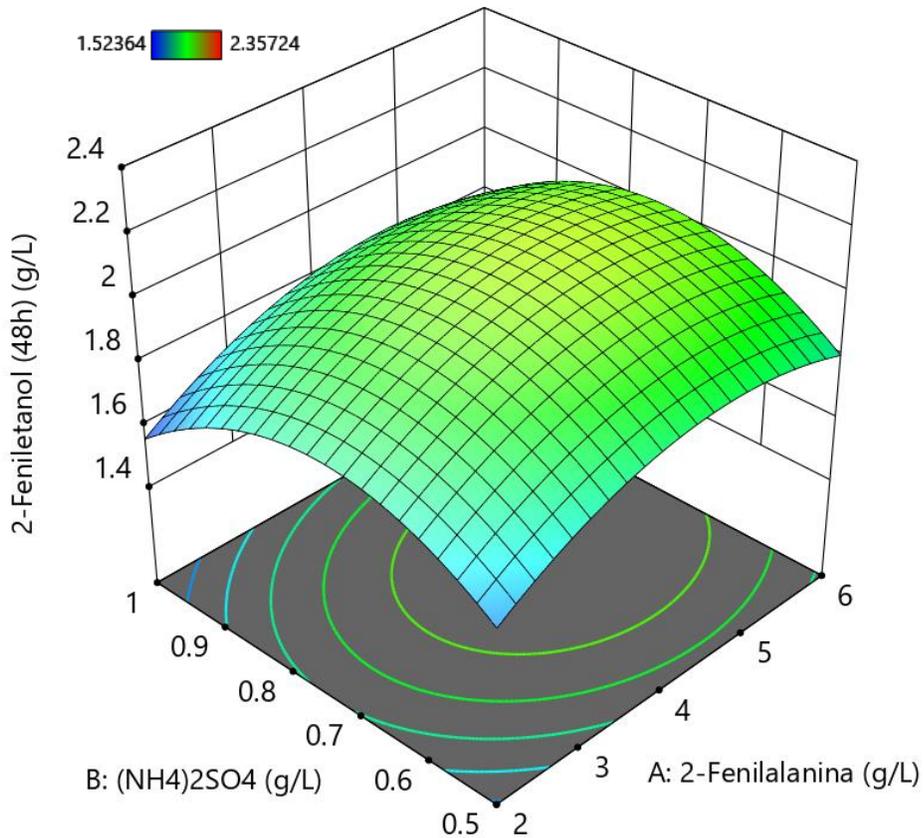
SC: suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *p: significancia estadística

A las 48 h de fermentación se observó que los términos lineal y cuadrático del precursor (**LFA**, **LFA²**) y el cuadrático de la sal ((**NH₄**)₂**SO₄**)² fueron los que presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre la producción del 2-FE, sin embargo, Hua y Xu [18], concluyen que la generación del metabolito se puede mejorar, seleccionando la fuente de carbono y la cantidad de L-fenilalanina que se va a adicionar al medio de cultivo, mencionan de igual forma, que la fuente de carbono puede afectar el rendimiento y la calidad final del producto.

El ANOVA del modelo resultó ser significativo (Ec. 4). El valor F de falta de ajuste de 0.74 implica que la falta de ajuste no fue significativo en relación con el error puro. Hay un 62.43% de posibilidades de que se produzca un valor F de falta de ajuste tan grande debido al ruido. La falta de ajuste no significativa (p = 0.4135) es buena, ya que el modelo se ajusta a los datos observados en los tratamientos. El comportamiento obedece a un modelo de segundo orden, la clara evidencia de ello es la superficie de respuesta (Figura 9), debido a que la forma que está posee, es típica de modelo cuadrático.

$$2FE = 2.05 + 0.0820 (\mathbf{LFA}) - 0.0256 ((\mathbf{NH4})_2\mathbf{SO4}) + 0.0130 (\mathbf{LFA} * (\mathbf{NH4})_2\mathbf{SO4}) - 0.1634(\mathbf{LFA})^2 - 0.1938 ((\mathbf{NH4})_2\mathbf{SO4})^2 \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

Por otra parte, se obtuvo una $R^2= 0.750$ y una R^2 ajustada= 0.823, se observa una



similitud entre ambas, reforzando que el modelo es significativo.

Figura 9. Superficie de respuesta de la fermentación de lactosuero dulce con *K. marxianus* a las 48 horas.

De acuerdo a la superficie de respuesta (Figura 9), para este tiempo, se encontraron valores de aproximadamente 2.35 g/L de 2-FE, con una concentración de 4.0 g/L del precursor y 0.7 g/L de sal, se continuó observando una tendencia cuadrática, aunque el contorno es diferente al obtenido a las 24 h, sin embargo, la curvatura que se logra apreciar, indica que estamos en un rango de exploración que se encuentra cerca de la región óptima. Para determinar la disminución de COT durante las 48 h de fermentación, se realizó un análisis de varianza.

Tabla 8. Análisis de Varianza del modelo de remoción de COT a las 48 h de fermentación.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	Valor F	*p
Modelo	286.24	3	95.41	78.84	< 0.0001
Fenilalanina (L-FA)	257.6	1	257.6	212.87	< 0.0001
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.76	1	6.76	5.59	0.0269
Interacción L-FA/(NH ₄) ₂ SO ₄	21.87	1	21.87	18.08	0.0003
Residuales	27.83	23	1.21		
Falta de ajuste	20.01	5	4	3.21	0.2635
Error puro	7.82	18	0.4344		
TOTAL	314.07	26			

SC: suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *p: significancia estadística

A partir de los resultados del ANOVA, se identificó que el modelo fue significativo, así mismo, se identificaron los términos del modelo (Ec. 5). Del análisis se obtuvo la siguiente ecuación.

$$\%COT = 47.14 - 3.78 (\text{LFA}) + 0.6130 ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) + 1.35 (\text{LFA} * (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) \dots \dots \dots \text{Ecuación 5}$$

Los términos lineales del precursor (LFA), de la sal ((NH₄)₂SO₄) y la interacción de los mismos (LFA * (NH₄)₂SO₄), fueron significativos para explicar la respuesta, presentando valores de R= 0.8750 y de R² ajustada= 0.8998 aceptables. El valor F de falta de ajuste de 3.21, implica que la falta de ajuste es no significativa. Solo hay una probabilidad del 26.35% de que se produzca un valor F de falta de ajuste tan grande debido al ruido. Una ausencia de falta de ajuste es buena, ya que queremos que el modelo explique el porcentaje de remoción de COT observado. En la superficie de respuesta correspondiente con la remoción de COT se identificó una disminución de la COT de aproximadamente 18,876.6 mg COT/L, con concentraciones de 2.0 g/L del aminoácido y 0.75 g/L de sal, estas condiciones son similares a las del tratamiento diez, del cual se tomó en cuenta su concentración de COT inicial para determinar el porcentaje de remoción, el cual fue del 52.37%.

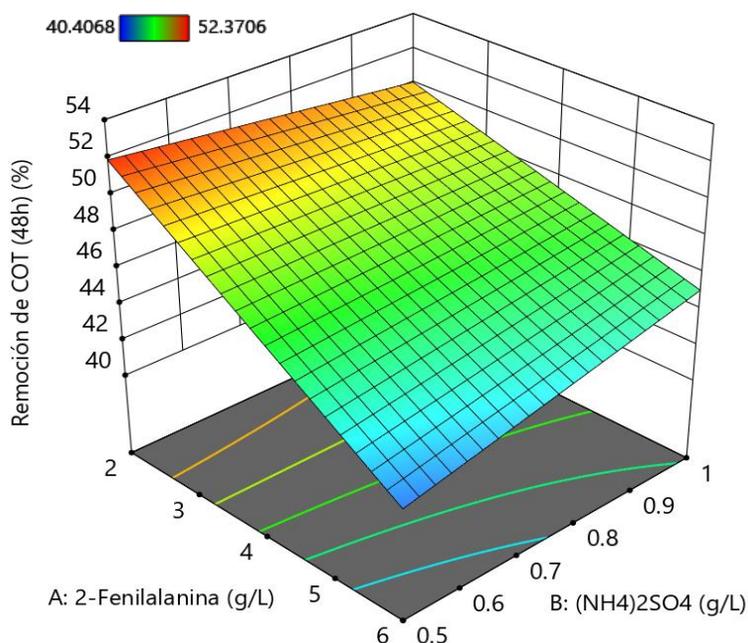


Figura 10. Superficie de respuesta de la remoción de COT a las 48 horas.

8.3.3 Fermentación a las 72 horas.

Durante la fermentación del lactosuero dulce, para la producción de 2-FE a las 72 h, se realizó un ANOVA de la producción del 2-FE, a un límite de confianza de 95%, los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis de Varianza del modelo cuadrático de producción de 2-FE a las 72 horas de fermentación.

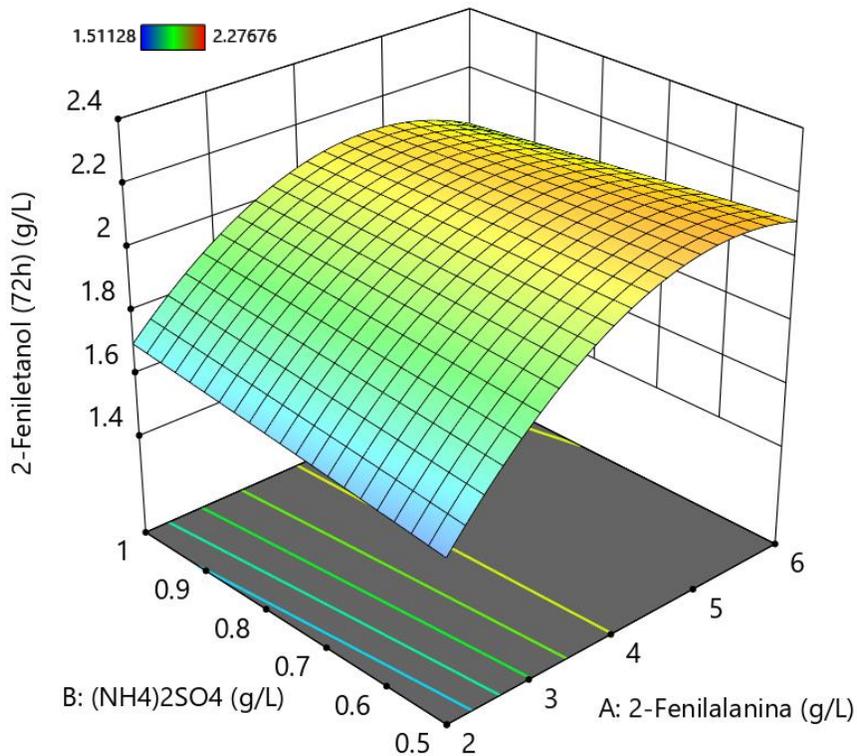
Fuente de Variación	SC	GL	CM	Valor F	*p
Modelo	1.14	5	0.2274	13.09	< 0.0001
Fenilalanina (L-FA)	0.8098	1	0.8098	46.62	< 0.0001
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0002	1	0.0002	0.0122	0.9132
Interacción L-FA/(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0355	1	0.0355	2.05	0.1674
(L-FA) ²	0.2916	1	0.2916	16.79	0.0005
((NH ₄) ₂ SO ₄) ²	0	1	0	0.0016	0.9688
Residuales	0.3648	21	0.0174		
Falta de ajuste	0.2068	3	0.0689	7.85	0.0015
Error puro	0.158	18	0.0088		
TOTAL	1.5	26			

SC: suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *p: significancia estadística

Con relación al ANOVA realizado, se logró identificar que el modelo fue significativo, así mismo, se identificó que los términos: lineal (LFA) y cuadrático (LFA)² del precursor fueron significativos, lo cual es consistente, debido a que, a lo largo del tiempo de fermentación, se ha observado que el mayor efecto en la producción del 2-FE se debe al aminoácido y diversos trabajos soportan este comportamiento. El modelo obtenido para las 72 h se presenta a continuación (Ec. 6).

$$2FE = 2.08 + 0.2121 (LFA) + 0.0034 ((NH_4)_2SO_4) - 0.0554 (LFA * (NH_4)_2SO_4) - 0.2204(LFA)^2 - 0.0021 ((NH_4)_2SO_4)^2 \dots\dots\dots Ecuación 6$$

Sin embargo, de acuerdo con la tabla 9, la falta de ajuste resulto ser significativa, lo cual no es deseable, sin embargo, se puede solucionar eliminando algunos términos del modelo o bien con la validación de este, por otra parte, se obtuvo una R²= 0.6886 y la R² ajustada= 0.7993, ambos valores concuerdan y confirman que el modelo se puede emplear para explicar la respuesta. De igual forma, se obtuvo la gráfica de superficie de



respuesta, la cual se muestra a continuación (Figura 11).

Figura 11. Superficie de respuesta de la fermentación de lactosuero dulce con *K. marxianus* a las 72 horas.

En la Figura 11 se observa una superficie de repuesta, cuya curvatura corresponde a un modelo cuadrático, lo cual favorece para observar una respuesta máxima dentro de la región de estudio, así mismo, se obtiene un valor de aproximadamente 2.22 g/L de 2-FE con concentraciones de 4.0 g/L de precursor y 0.5 g/L de sulfato de amonio.

El ANOVA de los resultados de porcentaje de remoción de COT a las 72 h se muestra en la Tabla 10. Se observó que los términos lineal y cuadrático del precursor, así como el término lineal de la concentración de sal son factores significativos, es decir, que, a las 72 h, la producción del metabolito está asociada con la cantidad de ambos componentes que se adicionaron al medio de cultivo durante la fermentación. Sin embargo, actualmente poco se conoce de la síntesis de alcoholes superiores en microorganismos diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, si bien, es un punto de partida, no se debe extrapolar su comportamiento molecular y enzimático con el de *K. marxianus*, por esta razón, es que resulta difícil conocer el efecto del aminoácido en la producción de aromas [48].

Tabla 10. Análisis de Varianza del modelo de remoción de COT a las 72 horas de fermentación

Fuente de Variación	SC	GL	CM	Valor F	*p
Modelo	150.16	5	30.03	38.72	< 0.0001
Fenilalanina (L-FA)	132.93	1	132.93	171.38	< 0.0001
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.54	1	3.54	4.56	0.0447
Interacción L-FA/(NH ₄) ₂ SO ₄	0.7011	1	0.7011	0.9039	0.3526
(L-FA) ²	10.74	1	10.74	13.84	0.0013
((NH ₄) ₂ SO ₄) ²	2.25	1	2.25	2.9	0.1033
Residuales	16.29	21	0.7757		
Falta de ajuste	5.72	3	1.91	3.25	0.0642
Error puro	10.57	18	0.5871		
TOTAL	166.44	26			

SC: suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrados medios; *p: significancia estadística

Interpretando los resultados de la tabla anterior, se observó que todos los términos del modelo fueron significativos, siendo este también significativo, sin embargo, la falta de

ajuste resulto no significativa, esta característica es favorable, debido a que deseamos que el modelo explique la respuesta. La validez del modelo es soportada tomando en cuenta otros parámetros como el valor de $R^2= 0.8393$ y el de la R^2 ajustada= 0.8788 , es decir que la mayoría de los datos se ajustan al modelo, por lo tanto, es recomendable utilizar este modelo (Ec. 7).

$$\%COT = 52.49 - 2.72 (LFA) - 0.4433 ((NH_4)_2SO_4) + 0.2417 (LFA * (NH_4)_2SO_4) - 1.34 (LFA)^2 + 0.6123 ((NH_4)_2SO_4)^2 \dots\dots\dots Ecuación 7$$

Por otra parte, se calculó el porcentaje de eficiencia de la remoción de COT, tomando en cuenta la máxima eliminación de este parámetro, gracias al gráfico de superficie de respuesta, fue posible identificarla con un valor de aproximadamente 55% de remoción.

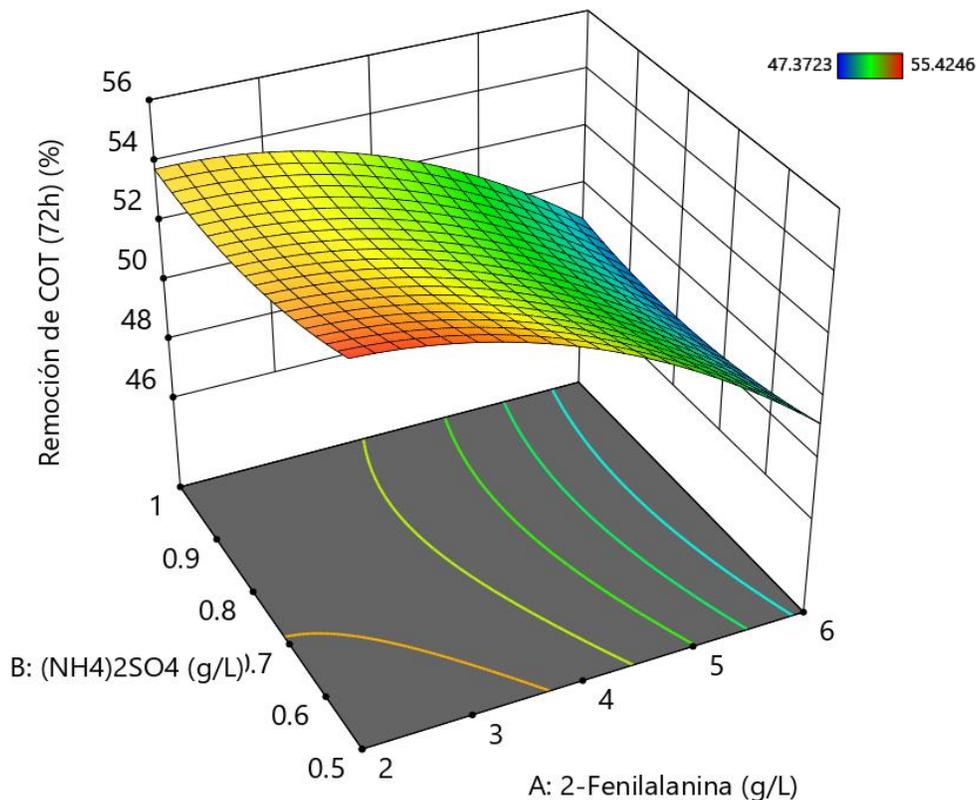


Figura 12. Superficie de respuesta de la remoción de COT a las 72 horas.

Las condiciones de remoción de COT, para las 72 h fueron 2.0 g/L de precursor y 0.5 g/L de sal, esta combinación es semejante a lo planteado en la corrida 6 (ver Tabla 5), su porcentaje de eficiencia fue de 55%. Estudios publicados por Murari y col. [49],

mencionan que, durante la fase exponencial, las levaduras consumen la fuente de carbono, es decir, la lactosa, dando lugar a la formación de ácidos orgánicos, posteriormente en la fase estacionaria los microorganismos pueden utilizar estos ácidos, como una medida para mantener su metabolismo celular y por consecuencia, contribuyen a la reducción del carbono orgánico [49, 50].

8.4 Validación de los valores optimizados.

Para llevar a cabo la optimización, se utilizó el software Design-Expert, versión 11, el cual contribuyó a estimar las condiciones óptimas de producción del metabolito, para los tres tiempos de fermentación. Se contrastaron tanto los modelos de producción de 2-FE como los de %COT para cada uno de los tiempos ensayados. Se realizaron alrededor de 100 corridas para cada modelo, las mejores condiciones encontradas se presentan en la Tabla 11. Con estas condiciones se corrieron experimentos adicionales con el fin de validar las respuestas predichas.

Tabla 11. Condiciones de experimentos para la validación de los modelos a los tres tiempos

Tratamiento	Concentración de precursor (g/L)	Concentración de sal (g/L)
24 h	4.000	0.500
48 h	4.575	0.579
72 h	4.300	0.636

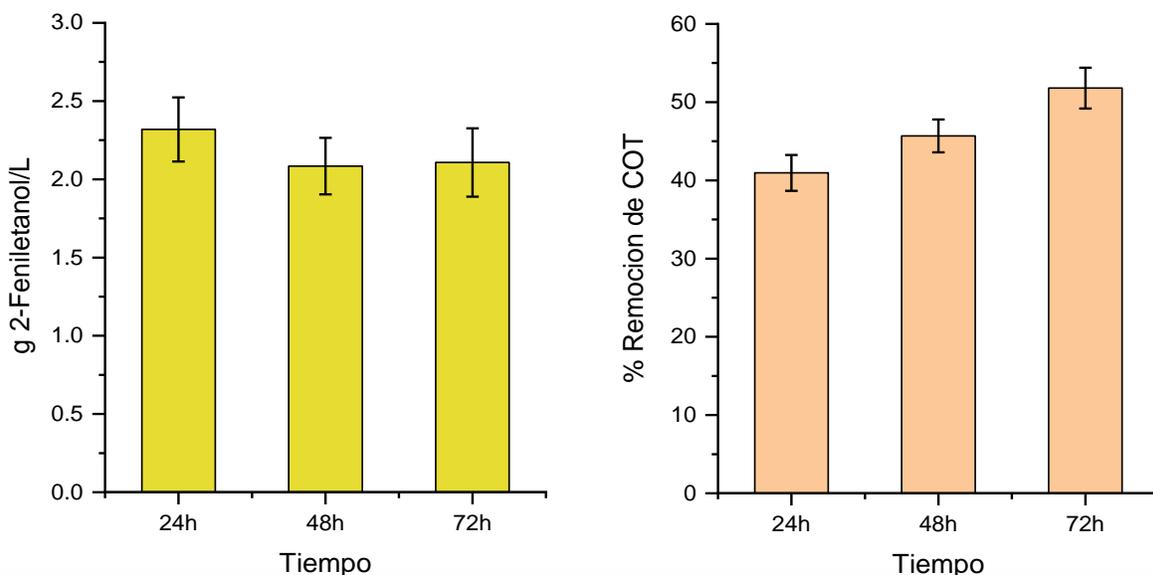


Figura 13. Comparación de medias entre los tratamientos respecto al tiempo para la validación.

A partir del gráfico de comparación de medias (Figura 13), se puede visualizar el comportamiento de los tratamientos, encontrando que a las 24 h se produce la mayor cantidad de 2-FE (2.32 ± 0.21 g/L), bajo las condiciones de estudio predichas. No obstante, en el análisis de comparación de medias mediante Tukey-Kramer se encontró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p=0.0756$, 95% IC) a cada uno de los tiempos de la Tabla 11. Cuando se compararon las medias de remoción de COT, se observó que hay diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$, 95% IC) entre los tratamientos, dándose la mayor remoción a las 72 h con un 51.79% mientras que la más baja fue a las 24 h (40.95%).

Aunque se incrementó en 10% el porcentaje de remoción a las 48 h, esto triplica el tiempo de fermentación. La concentración final del 2-FE generada a partir de los tratamientos aplicados, es muy similar, sin embargo, para términos de optimización, es necesaria una mejora del proceso, esta radica en nuestro caso, en disminuir el tiempo de fermentación, así como la disminución de la cantidad de aminoácido adicionado, ya que la reducción de ambos repercute en disminuir costos y energía, resultando una alternativa atractiva para un posterior escalamiento del proceso. Con respecto a la validación de los resultados estimados (modelo) y obtenidos experimentalmente, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual indica que se validaron los modelos propuestos y los valores de la optimización, eligiendo el tratamiento propuesto para las 24 h, debido a la mayor concentración de 2-FE obtenida, así como una menor concentración de precursor y de sal, que se adicionaran al lactosuero dulce, minimizando también tiempos de fermentación. En cuanto a la disminución de la carga orgánica, aun no es posible verter este efluente a cuerpos de agua o suelos, debido a que aún no cumple con los límites permisibles para su desecho, sin embargo, quizás una alternativa sería evaluar su reutilización para este proceso o bien, para la producción de etanol. Por lo anterior, se concluye que las mejores condiciones de operación son 24 h de fermentación, con 4 g/L de L-Fenilalanina y 0.5 g/L de sulfato de amonio.

Se presento una diferencia sustancial entre la fase exploratoria y la de optimización. En la primera etapa de este proyecto se encontró en la primera etapa que con 5 g de L-FE y 0.9 g de sulfato de amonio se alcanzó una concentración de 2-FE de 1.02 ± 0.05 g/L y bajo esas mismas condiciones se alcanzo el mayor porcentaje de remoción de DQO que fue de 66% a las 48 h de fermentación. Lo anterior contrasta fuertemente con los datos obtenidos en el diseño Box-Benken planteado y ensayado. Primero se optó por cambiar la medición de DQO a COT, debido a que la NOM correspondiente menciona que para aguas residuales cuya concentración de sales sea mayor a 1 g/L se deberá medir el COT en lugar de la DQO, debido a interferencias por las sales en las determinaciones. Al inicio del trabajo se eligió la DQO, ya que era el parámetro que mayormente se reportaba en literatura, no obstante, del cambio, los valores de remoción son cercanos si se toman en cuenta los factores de conversión entre COT y DQO [45].

El segundo cambio sustancial, que es la producción de 2-FE, se atribuye a la aireación, si bien se utilizaron los mismos volúmenes de operación y se utilizaron las mismas configuraciones de micro reactores; en esta ocasión por sugerencias del grupo de trabajo se adicionaron perlas de vidrio conforme a lo reportado por Esquivel y col. [51], cuya finalidad es mejorar la transferencia de oxígeno en el cultivo. Este cambio no permitió alcanzar concentraciones aún mayores de 2-FE, aunque sustancialmente no mejoro la remoción de carga orgánica. La diferencia en la producción se puede atribuir a la formación de otros sub-productos, que se generan durante la fermentación, un claro ejemplo de ello es el etanol, Conde-Báez y col. [22], reportaron concentraciones de este alcohol, que oscilaron entre 5.94 y 25.13 g/L, la presencia de este, en altas concentraciones, más el 2-FE, pueden causar una inhibición de crecimiento de la levadura por producto, dañando la membrana celular, así como reduciendo la capacidad de adsorción de las fuentes de carbono y de aminoácidos. También puede conducir a una deficiencia respiratoria, al generar mutaciones petite, este efecto sinérgico entre los dos alcoholes se ha observado en *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, lo mismo le puede suceder a *K. marxianus* [9, 6, 46, 52, 53, 54].

El proceso de fermentación microbiana es complejo, ya que pequeñas variaciones en la composición de los medios y en las condiciones de estudio, influyen en los rendimientos

de los metabolitos. Investigaciones realizadas por diversos autores avalan el papel fundamental de la concentración de las fuentes de carbono y de nitrógeno. Por ejemplo, tener diferentes fuentes de nitrógeno durante la fermentación reduce significativamente la producción de alcoholes superiores en cultivos de *Hanseniaspora vineae* (levadura usada en vitivinicultura), existe una variación en los alcoholes producidos en función del nitrógeno, lo que demuestra que las condiciones de cultivo y las especies de levadura son factores importantes. Por su parte, el contenido del aminoácido L-fenilalanina presente en el caldo de fermentación favorece la vía de Ehrlich, ya que la L-fenilalanina es la precursora de esta. La diferencia con la vía del Shikimato es que tiene varias regulaciones, relacionadas con la retroalimentación de ramas metabólicas que implican más pasos para lograr la bioconversión [55].

La producción de 2-FE permite observar que los tratamientos aplicados mejoran el tiempo de fermentación. Algunos autores sugieren considerar la producción de etanol, ya que el 2-FE y el etanol muestran un efecto sinérgico, inhibiendo la proliferación de levaduras, recomendándose evitar la acumulación de ambos durante el proceso de fermentación [53]. El último puede descartarse debido al efecto Crabtree en *K. Marxianus*. Hoy en día existen pocos estudios que exploran el uso de residuos industriales para producir compuestos aromáticos, especialmente utilizándolos crudos, es decir, sin diluir. La revisión realizada, presenta un análisis de las investigaciones que han utilizado residuos agroindustriales. Al igual que el mosto de uva, donde la producción de 2-FE fue de 0,39 g/L con 3 g/L de precursor en 84 h de cultivo. Al igual que el presente estudio, optimizaron la producción, tomando como variables el pH, la temperatura y la concentración de precursores [8]. En otro reporte [6], con melaza de remolacha azucarera, alcanzando 0,89 g/L con 7 g/L de L-fenilalanina en 48 h. La concentración de 2-FE en el presente estudio es superior a las reportadas.

9. CONCLUSIONES

Mediante la metodología de superficie de respuesta, empleando un diseño Box-Benken, se optimizó la producción del 2-FE, a partir de la fermentación de lactosuero con *K. marxianus*. La máxima remoción de carga orgánica se obtuvo a las 24 h, optimizando la adición L-fenilalanina a 4 g/L y la de la sal de amonio a 0.5 g/L, lográndose reducir hasta un 41%. Al mismo tiempo, estas condiciones resultaron ser mejores para la producción de 2-FE, obteniéndose 2.32 ± 0.21 g/L. Al triplicar el tiempo de fermentación no se observaron mejoras en la producción de 2-FE y solo se incrementó en un 10% la remoción de carga orgánica, lo cual no es energéticamente viable. El análisis de varianza de los tratamientos permitió visualizar la significancia del precursor y de la sal, para aumentar la producción del 2-FE y disminuir la COT, encontrando que la L-fenilalanina tiene un efecto significativo. Al validarse los resultados, se recomienda el uso de los modelos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. G. Siso, «The biotechnological utilization of cheese whey: a review,» *Bioresource technology*, vol. 57, nº 1, pp. 1-11, 1996.
- [2] K. Chreptowicz, M. Wielechowska, J. Głowczyk-Zubek, E. Rybak y J. Mierzejewska, «Production of Natural 2-Phenylethanol: From Biotransformation to Purified Product,» *Food and Bioproducts Processing*, vol. 100, p. 275–281, 2016.
- [3] M. G. Lambrechts y I. S. Pretorius, «Yeast and Its Importance to Wine Aroma - A Review,» *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 21, nº 1, p. 97–129, 2019.
- [4] M. Etschmann, W. Bluemke, D. Sell y J. Schrader, «Biotechnological Production of 2-Phenylethanol,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, nº 1, pp. 1-8, 2002.
- [5] X. Tian, R. Ye, J. Wang, Y. Chen, B. Cai, S. Guan y Q. Li, «Effects of Aroma Quality on the Biotransformation of Natural 2-Phenylethanol Produced Using Ascorbic Acid,» *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, nº 4, p. 286–290, 2015.
- [6] M. M. W. Etschmann, D. Sell y J. Schrader, «Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium,» *Biotechnology Letters*, vol. 25, nº 7, pp. 531-536, 2003.
- [7] R. M. Amaro y R. Belmont, «Producción de conocimiento científico y patrones de colaboración en la biotecnología mexicana,» *Entreciencias*, vol. 1, nº 2, pp. -, 2013.
- [8] K. Chreptowicz, M. K. Sternicka, P. D. Kowalska y J. Mierzejewska, «Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media,» *Letters in applied microbiology*, vol. 66, nº 2, pp. 153-160, 2018.

- [9] C. E. Fabre, P. J. Blanc y G. Goma, «Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*,» *Biotechnology progress*, vol. 14, nº 2, pp. 270-274, 1998.
- [10] C. Wittmann, M. Hans y W. Bluemke, «Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*,» *Yeast*, vol. 19, nº 15, pp. 1351-1363., 2002.
- [11] H. Y. Steensma, F. C. M. De Jongh y M. Linnekamp, «The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*,» *Current genetics*, vol. 14, nº 4, pp. 311-317, 1988.
- [12] S. N. Rocha, J. Abrahão-Neto y A. K. Gombert, «Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species,» *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 100, nº 4, pp. 619-630., 2011.
- [13] G. G. Fonseca, E. Heinzle, C. Wittmann y A. K. Gombert, « The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential.,» *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 79, nº 3, pp. 339-354, 2008.
- [14] G. C. Padín y F. M. Díaz, «Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes,» *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 29, nº 2, pp. 110-116, 2009.
- [15] W. Visser, W. A. Scheffers, B. V. C. Vegte, W. H. y J. P. van Dijken, «Oxygen requirements of yeasts,» *Applied and environmental microbiology*, vol. 56, nº 12, pp. 3785-3792., 1990.
- [16] J. P. van Dijken, R. A. Weusthuis y J. T. Pronk, «Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts,» *Antonie van leeuwenhoek*, vol. 63, nº 3, pp. 343-352, 1993.
- [17] L. H. Bellaver, N. M. B. de Carvalho, J. Abrahão-Neto y A. K. Gombert, «Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess,» *FEMS yeast research*,

vol. 4, nº 7, pp. 691-698, 2004.

- [18] D. Hua y P. Xu, «Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol,» *Biotechnology Advances*, vol. 29, nº 6, pp. 654-660, 2011.
- [19] X. Lu, Y. Wang, H. J. H. Zong, B. Zhuge y Z. Dong, «Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by the novel stress-tolerant yeast *Candida glycerinogenes*,» *WL2002-5. Bioengineered*, vol. 7, nº 6, pp. 418-423, 2016.
- [20] D. Serp, U. Von Stockar y I. W. Marison, «Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization.,» *Biotechnology and bioengineering*, vol. 82, nº 1, pp. 103-110, 2003.
- [21] C. Wittmann, M. Hans y W. Bluemke, «Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*,» *Yeast*, vol. 19, nº 15, pp. 1351-1363, 2002.
- [22] B. L. Conde, R. Castro, I. Villagómez, L. J. B. Páez y A. C. Gómez, «Evaluation of waste of the cheese industry for the production of aroma of roses (phenylethyl alcohol),» *Waste and Biomass Valorization*, vol. 8, nº 4, pp. 1343-1350, 2017.
- [23] G. R. G. I. L. B. E. Vela, M. Castro-Mundo, A. Caballero-Roque y E. J. Ballinas-Díaz, «Bebida probiótica de lactosuero adicionada con pulpa de mango y almendras sensorialmente aceptable en adultos mayores,» *ReCiTeIA*, vol. 11, nº 2, pp. 10-20, 2012.
- [24] R. H. Diniz, M. Q. Rodrigues, L. G. Fietto, F. M. Passos y W. B. Silveira, «Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.,» *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 3, nº 2, pp. 111-117, 2014.
- [25] D. E. Valencia y C. L. M. Ramírez, «La industria de la leche y la contaminación del

- agua,» *Elementos*, vol. 73, nº 1, pp. 16-27, 2009.
- [26] E. F. Cervantes, V. A. Cesín y O. I. Mamani, «La calidad estándar de la leche en el estado de Hidalgo, México.,» *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, vol. 4, nº 1, pp. 75-86, 2013.
- [27] D. Dimitrellou, K. Tsaousi, Y. Kourkoutas, P. Panas, M. Kanellaki y A. A. Koutinas, «Fermentation efficiency of thermally dried immobilized kefir on casein as starter culture.,» *Process Biochemistry*, vol. 43, nº 12, pp. 1323-1329, 2008.
- [28] A. A. Koutinas, H. Papapostolou, D. Dimitrellou, N. Kopsahelis, E. Katechaki, A. Bekatorou y L. A. Bosnea, «Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production,» *Bioresource Technology*, vol. 100, nº 15, pp. 3734-3739., 2009.
- [29] A. R. Prazeres, F. Carvalho y J. Rivas, «Cheese whey management: A review.,» *Journal of environmental management*, vol. 110, nº 1, pp. 48-68, 2012.
- [30] P. Sen, A. Nath, C. Bhattacharjee, R. Chowdhury y P. Bhattacharya, «Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides.,» *Biochemical engineering journal*, vol. 90, nº 1, pp. 59-72, 2014.
- [31] M. Hernández-Rojas y J. F. Vélez-Ruiz, «Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales,» *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, vol. 8, nº 2, pp. 13-22, 2014.
- [32] S. Jovanović, M. Barać y O. Maćej, «Whey proteins-properties and possibility of application.,» *Mljekarstvo*, vol. 55, nº 3, pp. 215-233., 2005.
- [33] Ghaly, A. E., Kamal y M. A, «Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction,» *Water Research*, vol. 38, nº 3,

pp. 631-644, 2004.

- [34] R. Mukhopadhyay, S. Chatterjee, B. P. Chatterjee, P. C. Banerjee y A. K. Guha, «Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*,» *International Dairy Journal*, vol. 15, nº 3, pp. 299-303, 2005.
- [35] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar y L. A. Escaleira, «Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry,» *Talanta*, vol. 76, nº 5, pp. 965-977, 2008.
- [36] B. Kavacik y B. Topaloglu, «Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure,» *Biomass and bioenergy*, vol. 34, nº 9, pp. 1321-1329, 2010.
- [37] K. Cury, M. A. Márquez, G. M. Flórez, D. L. Rhenals y A. D. Villadiego, «Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei*,» *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 16, nº 1, pp. 137-145, 2014.
- [38] R. Ramirez-Vargas, A. Ordaz, M. Carrion, I. Y. Hernandez-Paniagua y F. Thalasso, «Comparison of static and dynamic respirometry for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of a nitrifying process,» *Biodegradation*, vol. 24, nº 5, pp. 675-684, 2013.
- [39] AOAC, «Chemical Oxygen Demand (COD) of Water 976.46 E,» de *Official Methods of Analysis*, 15va ed., vol. 1, K. Helrich, Ed., Arlington, Virginia, Association of Official Analytical Chemists, Inc., 1990, pp. 316-317.
- [40] C. S. Murari, D. C. Moraes, G. F. Bueno y V. L. Del Bianchi, «Evaluation of the reduction in pollution of dairy products from whey fermentation in ethanol by yeast *Kluyveromyces marxianus*,» *Journal of Candido Tostes Dairy Institute*, vol. 68, nº 393, pp. 42-50, 2013.

- [41] R. S. Reinbold y J. Takemoto, «Use of Swiss cheese whey permeate by *Kluyveromyces fragilis* and mixed culture of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Bacillus megaterium*,» *Journal of Dairy Science*, vol. 71, nº 7, pp. 1799-1802,, 1988.
- [42] A. E. Ghaly y M. A. Kamal, «Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction,» *Water Research*, vol. 38, nº 3, pp. 631-644, 2004.
- [43] S. J. Bell y P. A. Henschke, «Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine,» *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 11, nº 3, pp. 242-295, 2005.
- [44] L. A. Hazelwood, J. M. Daran, A. J. Van Maris, J. T. Pronk y J. R. Dickinson, «The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism,» *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, nº 8, pp. 2259-2266, 2008.
- [45] D. Dubber y N. F. Gray, «Replacement of chemical oxygen demand (COD) with total organic carbon (TOC) for monitoring wastewater treatment performance to minimize disposal of toxic analytical waste,» *Journal of Environmental Science and Health Part* , vol. 45, nº 12, pp. 1595-1600, 2010.
- [46] N. Eshkol, M. Sendovski, M. Bahalul, T. Katz-Ezov, Y. A. Kashi y A. Fishman, «Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain,» *Journal of applied microbiology*, vol. 106, nº 2, pp. 534-542, 2009.
- [47] D. C. Montgomery, *Diseño y análisis de experimentos*. Tercera Edición, México: Editorial Iberoamérica, 1991, pp. 337-356.
- [48] L. Gethins, O. Guneser, A. Demirkol, M. C. Rea, C. Stanton, R. P. Ross y J. P. Morrissey, «Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*,» *Yeast*,

vol. 32, nº 1, pp. 67-76, 2015.

- [49] C. S. Murari, D. C. M. N. da Silva, B. L. da Silva y V. L. Del Bianchi, «Influence of the nutrient concentrations of whey on ethanol and biomass production and COD reduction,» *Acta Scientiarum. Technology*, vol. 39, nº 05, pp. 533-541, 2017.
- [50] A. Karim, N. Gerliani y M. Aïder, «*Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 333, p. 108818, 2020.
- [51] I. Esquivel-Rios, R. Ramirez-Vargas, G. R. Hernandez-Martinez, M. Vital-Jacome, A. Ordaz y F. Thalasso, «A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures,» *Biochemical engineering journal*, vol. 83, pp. 70-78, 2014.
- [52] R. Seward, J. C. Willetts, M. G. Dinsdale y D. Lloyd, «The effects of ethanol, hexan-1-ol, and 2-phenylethanol on cider yeast growth, viability, and energy status; synergistic inhibition,» *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 102, nº 6, pp. 439-443, 1996.
- [53] H. Wang, Q. Dong, A. Guan, C. Meng y Y. Guo, «Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement,» *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 112, nº 1, pp. 26-31, 2011.
- [54] D. Stark, D. Zala, T. Münch, B. Sonnleitner, I. W. Marison y U. Von Stockar, «Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, nº 2, pp. 212-223, 2003.
- [55] J. Liu, J. Jiang, Y. Bai, T. P. Fan, Y. Zhao, X. Zheng y Y. Cai, «Mimicking a new 2-phenylethanol production pathway from *Proteus mirabilis* JN458 in *Escherichia coli*,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 66, nº 13, pp. 3498-3504, 2018.

- [56] S. Yin, H. Zhou, X. Xiao, T. Lang, J. Liang y C. Wang, «Improving 2-phenylethanol production via Ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains.,» *Current microbiology*, vol. 70, nº 5, pp. 762-767, 2015.
- [57] C. Barrera, C. Domínguez y J. & Guzmán, *Agua y salud en México: patógenos y legislación*, Mexico.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Nº: 00115

Matrícula: 2221801685

Aprovechamiento de la fermentación del lactosuero para la producción de 2-feniletanol mediante *Kluyveromyces marxianus*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 13 del mes de febrero del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES
DR. CARLOS ALBERTO GOMEZ ALDAPA



ANGELICA JUAREZ GARCIA
ALUMNA

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: ANGELICA JUAREZ GARCIA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

ASESOR

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE
SANTAMARIA

ASESOR

DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

LECTOR

DR. CARLOS ALBERTO GOMEZ ALDAPA