

# Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de etanol de melaza de caña por *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011

Odalys Rodríguez-Gámez, Manuel de Jesús Serrat-Díaz, Miladis Camacho-Pozo y Jorge Erick Marín-Morán.\*

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Ave. Patricio Lumumba s/n. Correo electrónico: oroga@cebi.uo.edu.cu. \*Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.

Recibido: 4 de junio de 2010.

Aceptado: 18 de diciembre de 2010.

Palabras clave: etanol, melazas de caña, optimización, *Kluyveromyces marxianus*.  
Key words: ethanol, sugarcane molasses, optimization, *Kluyveromyces marxianus*.

**RESUMEN.** El alcohol, debido a sus múltiples usos, en particular como combustible renovable, ha devenido motivo de numerosas investigaciones en los últimos años con el propósito de mejorar la eficiencia económica de su producción. Una de las alternativas exploradas está relacionada con la búsqueda de levaduras termotolerantes y etanol-resistentes, capaces de superar las limitaciones que se presentan con las cepas tradicionalmente usadas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El presente estudio se realizó con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de etanol de melazas de caña con la levadura termotolerante y pectinolítica *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, mediante el uso de la Metodología Superficie de Respuesta. Se utilizó un diseño compuesto central rotacional para la optimización de tres parámetros: concentración de iones hidrógeno (pH), temperatura y concentración de azúcares reductores totales. Los datos experimentales se ajustaron a un polinomio de segundo orden con un coeficiente  $R^2$  de 0,931. La temperatura y concentración de azúcares reductores fueron las variables cuya influencia resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) sobre la producción de etanol. Las condiciones óptimas calculadas de la ecuación de regresión fueron: pH 4,55, temperatura 35,2 °C y concentración de azúcares reductores totales 105 g/L. Se obtuvieron valores experimentales promedio de productividad volumétrica, concentración de etanol y eficiencia de fermentación de 0,8 g/Lh, 53,1 g/L y 95,1 %, respectivamente, los cuales resultan compatibles con las exigencias de la producción industrial.

**ABSTRACT.** Ethyl alcohol, due to its diverse uses, mainly as alternative fuel, has aimed numerous researches in the last years, with the purpose to improve the economic efficiency of its production. An alternative, which has been evaluated is related with the search for thermotolerant and ethanol-resistant yeasts, with abilities to overcome the limitations observed in traditionally used strains of *Saccharomyces cerevisiae* specie. The present study was undertaken to find the optimal fermentation conditions for the ethanol production from sugarcane molasses with the thermotolerant and pectolytic yeast *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, by using the Response Surface Methodology. A Central Composite Rotable Design was used for the optimization of three factors: hydrogen ion concentration (pH), temperature and total reducing sugars concentration. The experimental data was fitted into a second order polynomial regression model with an  $R^2$  of 0,931. Temperature and reducing sugar concentration were the statistically significant factors ( $p < 0,05$ ) on the ethanol production process. Estimated optimal conditions from regression equation were as follow: pH 4,55, temperature 35,2 °C and total reducing sugar concentration 105 g/L. The average values experimentally obtained for volumetric productivity, ethanol concentration and fermentation efficiency were 0,8 g/Lh, 53,1 g/L y 95,1 %, respectively, which are in agreement with industrial production exigencies.

## INTRODUCCIÓN

El etanol, portador energético renovable y menos contaminante que los combustibles fósiles, ha cobrado una relevancia significativa en la misma medida en que el petróleo se encarece cada día más y se aproxima su agotamiento definitivo.<sup>1</sup> Por ello, constituye un reto inmediato incrementar sus niveles de producción y reducir los costos, a fin de satisfacer la demanda siempre creciente de carburantes líquidos.

En consonancia con esto, las investigaciones han estado dirigidas a mejorar la rentabilidad del proceso productivo. El problema ha sido abordado desde los

más diversos ángulos, tales como la utilización de los materiales lignocelulósicos como sustratos para la fermentación,<sup>2</sup> el desarrollo de cepas más eficientes<sup>3</sup> y la optimización de los parámetros físico químicos del proceso de fermentación.<sup>4</sup>

La levadura mesofílica *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más ampliamente usado en la producción de etanol, debido a su elevada productividad y alta tolerancia a etanol. Sin embargo, en países tropicales sus indicadores de eficiencia productiva se ven sensiblemente afectados debido a las elevadas temperaturas que se alcanzan en los medios de fermentación a escala

industrial. En tal sentido, la búsqueda de cepas etanol-resistentes y termotolerantes ha devenido en una activa área de investigación en los últimos años.<sup>5-7</sup> Entre otras ventajas, la fermentación alcohólica con organismos termotolerantes posibilita obtener mayores productividades volumétricas, reduce los riesgos de contaminación y muerte celular, así como el consumo energético en la recuperación del etanol.<sup>6</sup>

Entre las levaduras termotolerantes, especial énfasis ha sido puesto en aquellas pertenecientes a la especie *Kluyveromyces marxianus*, organismo que ya cuenta con el estatus GRAS (seguro para el hombre).<sup>8</sup> Existen varios estudios que refieren la producción eficiente de etanol a temperaturas por encima de 40 °C por distintas cepas de esta levadura,<sup>9-12</sup> aunque en general la tolerancia a etanol en esta especie es considerada baja.<sup>11,13</sup>

Estudios previos realizados por el grupo de trabajo de los autores con la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011 señalan la posibilidad de su uso para la producción de alcohol a escala industrial, con el atractivo adicional de que su empleo permitiría diversificar la industria alcohólica, ya que esta cepa acumula de forma concomitante con la producción de etanol un producto de gran valor agregado: la enzima pectinolítica endopoligalacturonasa.<sup>14</sup> Es por ello que se impone conocer cuáles serían las potencialidades reales de esta cepa bajo condiciones óptimas de fermentación, utilizando la melaza de caña como sustrato, por ser esta la materia prima fundamental en la industria alcohólica cubana.

La optimización de procesos fermentativos es un problema complejo que ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, debido al impacto económico de los productos obtenidos por esta vía.<sup>15</sup> Con este propósito, el uso de diseños estadísticos de experimentos, como los agrupados bajo la denominación de Metodología de Superficies de Respuesta (MSR), ha cobrado mucho auge. Esta permite identificar el efecto simultáneo de varias variables independientes sobre la respuesta estudiada. La MSR ha sido muy utilizada para optimizar la fermentación alcohólica y otros medios de fermentación.<sup>16,17</sup>

Atendiendo a lo antes señalado, este trabajo tuvo como objetivo evaluar las potencialidades de la cepa *K. marxianus* 2011 para la producción de alcohol a partir de melaza de caña, mediante la determinación de pH óptimo (como concentración de iones hidrógeno [H<sup>+</sup>]), temperatura y concentración de azúcares reductores totales (ART) a través de un diseño compuesto central rotacional (DCCR) correspondiente a la MSR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó la cepa *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, de la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.

### Melaza

Se empleó melaza de caña fresca, procedente del Complejo Agroindustrial "Dos Ríos", Palma Soriano. Se le realizó una clarificación ácida en caliente<sup>18</sup> para la remoción de lodos y material coloidal y finalmente, se conservó en frascos plásticos de cierre hermético a 8 °C.

### Preparación del inóculo

Un frasco cónico de 250 mL, con 50 mL de medio YPD [extracto de levadura (1 %), peptona (2 %) y glucosa (2 %)], se inoculó con una azada de un cultivo fresco de

la levadura crecida en cuñas de medio YPD sólido [agar bacteriológico (2 %)]. Se incubó con agitación a 30 °C y 200 r/min durante 24 h. Con este cultivo, se inoculó [1 % (v/v)] un frasco cónico de 250 mL con 50 mL del medio de propagación, compuesto por melaza de caña clarificada, dosificada para rendir un contenido de ART de 20 g/L, suplementada con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g/L) y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g/L) como fuentes de nitrógeno y fósforo.<sup>19</sup> El cultivo se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta fase exponencial tardía. Entonces, se le midió la absorbancia a 620 nm para conocer la concentración celular y se tomó un volumen tal que correspondiera a 250 mg de biomasa (base seca), se centrifugó (6 000 r/min, 10 min) y la biomasa sedimentada se resuspendió en 25 mL de agua destilada estéril, para obtener una suspensión celular con una concentración de 10 mg/mL.

### Fermentación alcohólica

Las diferentes concentraciones de ART en los medios de cultivo se obtuvieron mediante diluciones de la melaza con agua destilada. En todos los casos, los medios se suplementaron con fuentes minerales de N, P, Ca y Mg, atendiendo a resultados previos obtenidos en el laboratorio durante la fermentación alcohólica del jugo de caña con esta cepa de levadura.<sup>20</sup> Las sales minerales utilizadas y su concentración final en los medios fueron: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,48 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,73 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,33 g/L) y MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,54 g/L). El pH se ajustó al valor deseado con disoluciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol/L o KOH 1 mol/L, según el caso. Los medios se esterilizaron a 110 °C durante 15 min.

Los ensayos de fermentación se realizaron en frascos de cristal de color ámbar, provistos de tapas de rosca, con una capacidad 30 mL. A estos, se les añadió 15 mL de medio de cultivo, bajo las condiciones establecidas de acuerdo con el diseño experimental planteado. Los cultivos se inocularon [10 % (v/v)] con la suspensión recién preparada de la levadura, para dar una concentración de biomasa inicial de 1 mg/mL y se incubaron en reposo para posibilitar el desarrollo de condiciones de limitación de oxígeno, necesarias para la fermentación alcohólica. El curso de la fermentación se siguió gravimétricamente, teniendo en cuenta que por cada gramo de glucosa consumido se produce una pérdida de peso teórica de 0,48 g correspondientes al CO<sub>2</sub> liberado. Para ello, los frascos se pesaron (± 5 mg) cada 6 h en balanza semianalítica (Sartorius). La fermentación se detuvo cuando no se observó variación del peso y se asumió como tiempo de fermentación la primera de las mediciones en las que se observó constancia del peso.

### Determinaciones analíticas

La concentración de etanol se determinó por el método de microdifusión y colorimetría de Conway<sup>21</sup> y los ART se cuantificaron por el método de Somogyi-Nelson.<sup>22,23</sup> La concentración de biomasa se estimó a partir de medidas de absorbancia a 620 nm, según la relación cuantitativa obtenida experimentalmente en este trabajo:

$$A_{620} = 1,60 [\text{concentración celular, base seca (g/L)}].$$

Intervalo útil: 0,02-0,62 unidades de absorbancia.

### Diseño experimental y técnica de optimización

Se utilizó la MSR, basada en un DCCR,<sup>24</sup> con el objetivo de estudiar el efecto de tres variables independientes: X<sub>1</sub> = concentración de iones hidrógeno ([H<sup>+</sup>]) (μmol/L), X<sub>2</sub> = temperatura (°C) y X<sub>3</sub> = concentración de ART (g/L), sobre la producción de etanol (variable dependiente, Y),

expresada como concentración en el medio (g/L) al finalizar la fermentación. La selección de las variables independientes y sus respectivos rangos, se hizo sobre la base de resultados previos obtenidos por los autores<sup>20</sup> (Tabla 1).

Para los cálculos estadísticos las variables  $x_i$  se codificaron como  $X_i$  de acuerdo con la ecuación:

$$X_i = (x_i - x_i^*) / \Delta x_i \quad I = 1, 2, 3, \dots, k \quad (1)$$

donde:

$X_i$  valor codificado (adimensional) de la variable independiente.

$x_i$  y  $x_i^*$  valores de dicha variable expresados en unidades reales, para los diferentes niveles evaluados y en el punto central (valor medio), respectivamente.

$\Delta x_i$  tamaño de paso (diferencia entre el nivel medio y el inferior).

**Tabla 1.** Codificación y niveles de las variables independientes consideradas en el DCCR.

Variable		Niveles codificados				
		-1,682	-1	0	1	1,682
[H <sup>+</sup> ] (μmol/L)	X <sub>1</sub>	4,2	11,2	21,4	31,640	38,5
T (°C)	X <sub>2</sub>	24	28	34	125	44
ART (g/L)	X <sub>3</sub>	58	75	100	—	142

[H<sup>+</sup>] Concentración de iones hidrógeno. T Temperatura.  
ART Concentración de azúcares reductores totales.

Este diseño contempla 16 tratamientos (Tabla 2), ejecutados en un solo bloque, de los cuales 8 (2<sup>3</sup>) corresponden a un arreglo factorial en dos niveles (-1,1), dos a repeticiones del tratamiento central (nivel 0) y seis a los tratamientos axiales (-α,α), donde α = 2<sup>n/4</sup>, siendo n el número de variables independientes. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y se tomó el valor medio de la respuesta para el análisis estadístico.

Los datos obtenidos se ajustaron a un polinomio de segundo orden del tipo:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{22} X_2^2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{33} X_3^2 \quad (2)$$

donde:

Y respuesta predicha.

b<sub>0</sub> constante, que representa el valor de la respuesta en el punto central.

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> efectos lineales.

b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub>, b<sub>33</sub> efectos cuadráticos.

b<sub>12</sub>, b<sub>13</sub>, y b<sub>23</sub> términos de interacción entre los factores.

### Análisis estadístico

Los datos experimentales del DCCR se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para establecer la significación estadística de los efectos independientes, así como a un análisis de regresión para ajustar los datos al modelo propuesto. La prueba F se utilizó como criterio para establecer la significación estadística de los efectos estudiados, en tanto el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), el estadístico de Durbin-Watson y el de autocorrelación residual, se utilizaron como criterios para verificar la bondad del ajuste. El gráfico de paridad (valores predichos

**Tabla 2.** Matriz de experimentos del DCCR. Valores experimentales y predichos de concentración de etanol.

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Concentración de etanol (g/L)	
				Experimental <sup>1</sup>	Predicho <sup>2</sup>
1	-1	1	1	42,7	44,4 ± 4,8
2	0	0	1,682	44,2	43,6 ± 4,8
3	-1	-1	-1	22,9	24,1 ± 5,0
4	1	1	1	46,9	44,0 ± 4,8
5	1	-1	1	33,0	35,3 ± 5,0
6	0	1,682	0	27,0	31,3 ± 4,5
7	-1,682	0	0	44,5	45,2 ± 4,8
8	1	-1	-1	36,9	33,4 ± 5,0
9	1	1	-1	40,7	40,4 ± 4,8
10	0	0	0	52,5	52,6 ± 4,6
11	0	1,682	0	33,2	31,3 ± 4,5
12	-1	1	-1	40,4	36,4 ± 4,8
13	0	0	-1,682	32,2	35,3 ± 4,8
14	1,682	0	0	50,9	52,7 ± 4,8
15	-1	-1	1	31,8	30,4 ± 5,0
16	0	0	0	53,1	52,6 ± 4,6

<sup>1</sup> El error relativo experimental promedio de las determinaciones fue inferior al 10 %.

<sup>2</sup> Valores predichos por el modelo ± error estándar en la estimación (p < 0,05).

vs. observados) se ajustó mediante regresión lineal a una recta con intersección en el origen y se comprobó la no existencia de diferencias significativas de la pendiente con respecto a la unidad. En todos los casos, se utilizó un nivel de significación del 5 %. Todos los análisis y gráficos se realizaron con la ayuda del paquete de programas Statgraphics Plus 3.1.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los valores experimentales obtenidos al ejecutar la matriz del DCCR para la optimización de la producción de etanol a partir de melaza, se realizó un análisis de regresión y se obtuvo la ecuación del modelo que mejor se ajusta a estos resultados, la cual viene dada por:

$$Y = 52,587 + 2,231X_1 + 5,239X_2 + 2,466X_3 - 1,287X_1^2 - 1,338X_1X_2 - 1,113X_1X_3 - 10,623X_2^2 + 0,438X_2X_3 - 4,645X_3^2 \quad (3)$$

Las concentraciones de etanol obtenidas experimentalmente y las predichos por la Ec. 3 para el conjunto de experimentos realizados (Tabla 2 y Fig. 1) mostraron una aceptable correspondencia entre ambos grupos de valores. En el gráfico de paridad se observó una distribución de los puntos en torno a la diagonal, con una pendiente estimada de  $0,997 \pm 0,015$ , la cual no difirió significativamente de la unidad ( $p < 0,01$ ), y una dispersión muy pequeña alrededor de la recta de regresión ( $R^2 = 0,997$ ). Debe señalarse que en esta validación de la capacidad predictiva del modelo no se incorporaron puntos adicionales a los generados por el diseño, lo cual constituyó una limitación en el análisis.

La bondad del ajuste se corroboró también mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 3), el cual reveló que el 93,1 % ( $R^2$ ) de la variación total observada era explicada por el modelo. Otro criterio que confirmó la validez de la Ec. 3 para la interpretación de los resultados experimentales lo ofreció el error medio absoluto, cuyo valor de 1,90 g/L estuvo en correspondencia con la baja dispersión observada al graficar los valores predichos y observados (Fig. 1). El estadístico de Durbin-Watson indicó que no hubo autocorrelación serial significativa ( $p > 0,05$ ).

Se encontró que no existen interacciones significativas ( $p > 0,05$ ) entre las variables independientes estudiadas (Tabla 3). El efecto cuadrático de la temperatura ( $p < 0,05$ ) fue el más importante, el cual contribuyó con

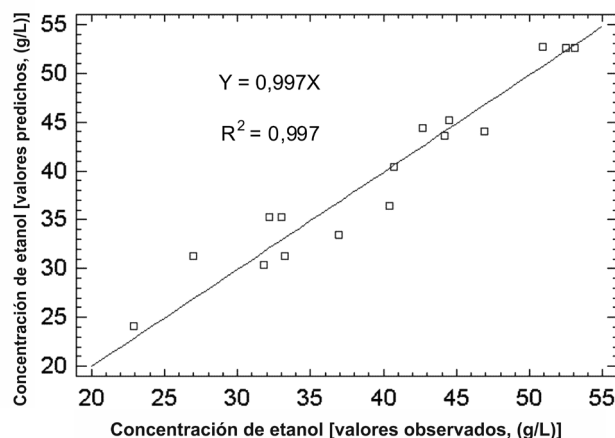


Fig. 1. Correlación entre las concentraciones de etanol experimentales y las predichas.

un 57,0 % de la variación total explicada, seguido por el efecto lineal de esta misma variable y el cuadrático de la concentración de ART, con contribuciones a la variación total explicada del 16,5 y el 12,9 %, respectivamente. Ninguno de los restantes efectos influyó de forma estadísticamente significativa en la respuesta estudiada.

Este comportamiento de la producción de etanol con respecto a la temperatura sugiere la existencia de un cierto valor óptimo de esta variable independiente, a partir del cual, las concentraciones de etanol deben disminuir progresivamente. Desde el punto de vista fisiológico, este hecho estuvo relacionado con la disminución de la tolerancia a etanol por parte de la levadura, a medida que se incrementaba la temperatura. Una temperatura elevada puede ocasionar cambios en la actividad de transporte o en los niveles de saturación de compuestos solubles dentro de las células, lo cual conduce a un incremento en la concentración de etanol intracelular y por ende, de su toxicidad.<sup>25,26</sup>

Con respecto a la concentración de ART, se observó un efecto similar al de la temperatura, pero menos acentuado y de mucha menor significación estadística. Un incremento en la concentración de azúcares fermentables debe conducir a un incremento en la concentración de etanol, siempre que la eficiencia de fermentación permanezca constante, lo cual no se corresponde con lo observado experimentalmente. Esta aparente contradicción puede

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de etanol.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	P
X <sub>1</sub>	67,952	1	67,952	4,81	0,071
X <sub>2</sub>	250,437	1	250,437	17,72	0,006
X <sub>3</sub>	83,072	1	83,072	5,88	0,052
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	15,063	1	15,063	1,07	0,342
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	863,309	1	863,309	61,08	0,000
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	196,144	1	196,144	13,88	0,010
X <sub>1</sub> ·X <sub>2</sub>	14,311	1	14,311	1,01	0,353
X <sub>1</sub> ·X <sub>3</sub>	9,901	1	9,901	0,70	0,435
X <sub>2</sub> ·X <sub>3</sub>	1,531	1	1,531	0,11	0,753
Error total	84,805	6	14,134		
Total (corr.)	1 231,3	15			

$R^2 = 0,932$ ;  $R^2$  (ajustada) = 0,828. Error estándar del estimado = 3,76 g/L. Error absoluto medio = 1,90 g/L. Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,021. Estadístico Durbin-Watson = 2,005 (P = 0,542).



explicarse, principalmente, en virtud del efecto tóxico del etanol sobre la levadura. A partir de una cierta concentración de ART, se alcanzarán concentraciones de etanol que resultarán notablemente inhibitoras para el crecimiento de la levadura y que incrementarán la tasa de muerte celular. De este modo, el aprovechamiento de los azúcares residuales será en extremo lento, e incluso nulo. Serrat y col.,<sup>14</sup> en un estudio de fermentación alcohólica con esta cepa, usando melazas de remolacha como sustrato, refieren que cuando la concentración de etanol en el medio alcanza los 25 g/L, el crecimiento microbiano prácticamente cesa, aunque la producción de etanol continúa, lo que se ajusta a los resultados aquí obtenidos.

Al graficar la superficie de respuesta y las curvas de contorno para la producción de etanol en función de la temperatura y la concentración de ART, a una concentración de iones hidrógeno constante a 21,4  $\mu\text{mol/L}$  se apreció la existencia de un máximo global en las proximidades del centro del área explorada, lo cual indicó lo acertado de los intervalos seleccionados para cada una de las variables independientes en estudio (Fig. 2). La resolución analítica de la ecuación de regresión (Ec. 3) para encontrar este máximo global, proporcionó los valores óptimos de las tres variables independientes en su forma codificada, los cuales fueron:  $X_1 = 0,674$ ;  $X_2 = 0,208$  y  $X_3 = 0,195$ . Los valores descodificados de las variables estudiadas para la respuesta optimizada fueron:  $[\text{H}^+] = 28,3 \mu\text{mol/L}$  (pH = 4,55); temperatura = 35,2 °C y concentración de ART = 105 g/L. Para estas condiciones el modelo estima una concentración de etanol de 54,1 g/L. Los resultados experimentales mostraron un máximo de producción de etanol de 53,1 g/L, alcanzado en el experimento 16, en condiciones muy cercanas a las predichas por el modelo, lo cual concordó con los resultados predichos.

Esta producción de etanol a partir de melaza de caña en las condiciones óptimas determinadas en este trabajo significan un incremento del 33 % (13,5 g/L) con respecto a la alcanzada en condiciones subóptimas empleando *K. marxianus* CCEBI 2011,<sup>14</sup> lo cual resulta de gran valor desde el punto de vista de la economía del bioproceso. Estas concentraciones de alcohol son significativamente superiores a las encontradas por Hack y Marchant<sup>11</sup> que obtienen una concentración final de etanol de 44,3 g/L utilizando la cepa *K. marxianus* IMB3 en melazas. Con esta misma cepa, en condiciones optimizadas, Gough et al.<sup>10</sup> alcanzaron concentraciones óptimas de etanol comparables a las obtenidas en este trabajo, aunque operando a una temperatura ligeramente superior (37 °C). Los valores experimentales promedio de productividad volumétrica y eficiencia de la fermentación alcanzados en esta experiencia, de 0,8 g/Lh y 95,1 %, respectivamente, son compatibles con las exigencias de la producción industrial.<sup>19</sup>

El hecho de que con la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011 se alcancen producciones óptimas de etanol de 54 g/L a 35 °C y concentraciones superiores a 40 g/L [ $> 5 \%$  (v/v)] a 40 °C (Tabla 2), ofrece una interesante perspectiva para la industria alcoholera cubana. Téngase en cuenta que las cepas de *S. cerevisiae* tradicionalmente usadas, exigen controlar la temperatura del proceso de 33 a 35 °C,<sup>19</sup> por encima de este límite los rendimientos disminuyen sensiblemente. Por otro lado, al uso de esta cepa se adicionan otras ventajas, tales como su estatus GRAS, su elevada velocidad de crecimiento, su capacidad para utilizar y fermentar una amplia variedad de sustratos<sup>8</sup> y la posibilidad que brinda de diversificar y valorar la producción de alcohol debido a su cualidad de producir de forma simultánea la enzima endopoligalacturonasa, de múltiples aplicaciones en la industria alimenticia y la agricultura.

## CONCLUSIONES

La aplicación de la MSR en el presente estudio permitió determinar la influencia del pH (expresado como concentración de iones hidrógeno), la temperatura y la concentración de ART sobre la producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, cuando se emplea melaza de caña como sustrato. Al mismo tiempo, posibilitó establecer la combinación óptima a utilizar de estas variables para maximizar la producción de alcohol. Los resultados avalan las potencialidades de esta levadura para ser utilizada en la industria alcoholera, como una atractiva alternativa a la convencional *S. cerevisiae*, debido a su elevada producción de alcohol a temperaturas de 35 a 40 °C y a sus posibilidades de integrarse en una industria alcoholera diversificada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 2006;24:549–56.
- Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):1207–12.
- Hughes SR, Hector RE, Rich JO, Qureshi N, Bischoff KM, Dien BS, et al. **Automated yeast mating protocol using open reading frames from *Saccharomyces cerevisiae*** genome to improve yeast strains for cellulosic ethanol production. *Journal of the Association for Laboratory Automation.* 2009;14(4):190–9.
- Bandaru VV, Bandaru SR, Somalanka SR, Mendu DR, Imandi SB, Bejawada SR, et al. Optimization of fermentation parameters to enhance the production of ethanol from palmyra jaggery using *Saccharomyces cerevisiae* in a batch fermentor. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007;143(3):224–35.

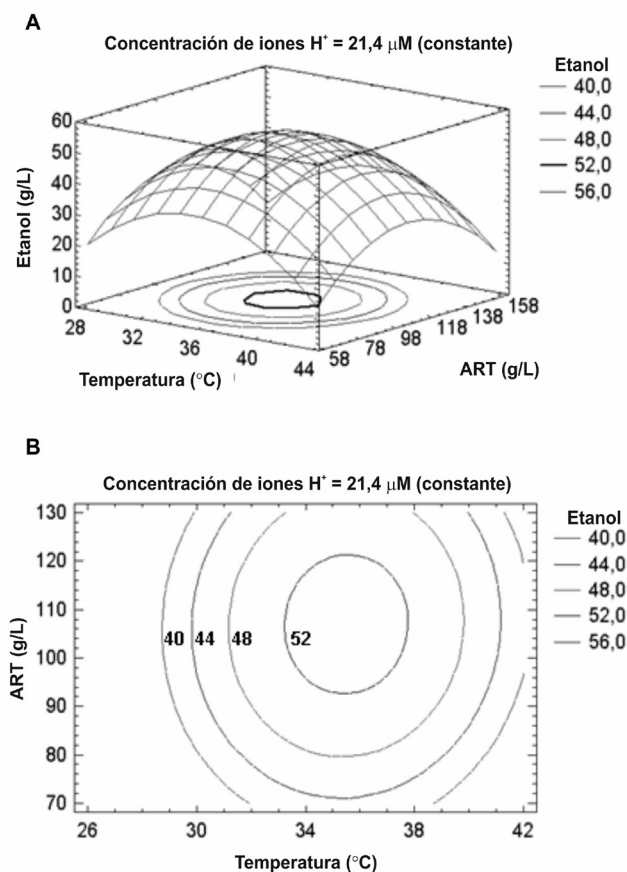


Fig. 2. Superficie de respuesta (A) y curvas de contorno (B) de producción de etanol vs. temperatura y concentración de ART.

5. Anderson PJ, McNeil K, Watson K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51:1314-20.
6. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R, McHale AP. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. *World J Microbiol Biotechnol.* 1998;14:809-21.
7. Nonklang S, Andel-Banat BMA, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, *et al.* High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:7514-21.
8. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann Ch, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79:339-54.
9. Nonklang S, Ano A, Abdel-Banat BMA, Saito Y, Hoshida H, Akada R. Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(5):1090-95.
10. Gough S, Flynn O, Hack CJ, Marchant R. Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimisation of media supplements. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46(2):187-97.
11. Hack CJ, Marchant R. Characterization of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998;20:323-27.
12. Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol.* 2007;98(17):3367-74.
13. Ballesteros I, Oliva JM, Carrasco JC, Ballesteros M. Effect of media supplementation on ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation process. *Appl Biochem Biotechnol.* 1994;45/6:283-94.
14. Serrat M, Bermúdez RC, Villa TG. Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: Potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004;117:49-64.
15. Mendes R, Rocha I, Ferreira E, Rocha M. A comparison of algorithms for the optimization of fermentation processes. *IEEE Congress on Evolutionary Computation*, 16 al 21 de julio de 2006, Vancouver, BC, Canada; 2006.
16. Bandaru VV, Somalanka SR, Mendu DR, Madicherla NR, Chityala A. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Enzyme Microb Technol.* 2006;38:209-14.
17. Ratnam BV, Narasimha RM, Damodara RM, Subba RS, Ayyanna C. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003;19:523-6.
18. Klibansky MM. Selección y evolución productiva y de composición de levaduras para el consumo humano. [Tesis en opción al grado de candidato a doctor, La Habana, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1987.
19. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña Azúcar. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar. 2da ed. México, D.F., México: GEPLACEA: 1990:p.223-231.
20. Rodríguez O. Estudio de la coproducción de endopoligalacturonasa y etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir del jugo de la caña de azúcar. [Tesis en opción al título académico de master en Biotecnología]. Santiago de Cuba, Universidad de Oriente, 2008.
21. Conway EJ. *Micro-diffusion Analysis and Volumetric Error*. London: Crosby, Lockwood and Son, Ltd: 1947:**357 pp.?**
22. Somogyi M. Notes of sugar determinations. *J. Biol. Chem.* 1952;159:19-23.
23. Nelson NJ. Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol.* 1957;3:85-86.
24. Montgomery DC. *Response Surface Methods and other Approaches to Process Optimization. Design and Analysis of Experiments.* 4th ed. New York: Wiley: 1997:p.372-422.
25. McMeekin TA, Olley J, Ratkowsky DA, Ross T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *Int J Food Microbiol.* 2002;73:395-407.
26. Phisalaphong M, Srirattana N, Tanthapanichakoon W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochem Eng J.* 2006;28(1):36-43.