



Universitat Autònoma de Barcelona

Permeados concentrados de suero de quesería como medio de fermentación para la producción de etanol alimentario

Rafael Eduardo Betancor Pernia

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

**Permeados concentrados de suero de quesería
como medio de fermentación para la producción de
etanol alimentario**

Tesis doctoral

Rafael Eduardo Betancor Pernia

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), noviembre 2019

ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Catedrático de Universidad del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y AMÉRICA JOSEFINA QUINTERO CHACÓN, Profesora Titular de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET),

HACEN CONSTAR: que **Rafael Eduardo Betancor Pernia** ha realizado, bajo nuestra dirección, en el área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), el trabajo titulado “Permeados concentrados de suero de quesería como medio de fermentación para la producción de etanol alimentario” que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos.

Y para que así conste firmamos el presente documento en:

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 1 de octubre de 2019.

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dra. América Josefina Quintero Chacon

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio José Trujillo Mesa, por la dirección de este trabajo, su compromiso, comprensión, paciencia y dedicación. Ha sido un verdadero honor haber trabajado bajo su tutela, sin su apoyo no hubiera logrado culminar este proyecto.

A la Dra. América Josefina Quintero Chacón, una persona comprometida, paciente y organizada, que intervino de manera decidida en crear las condiciones necesarias para la realización de la parte experimental.

Al MsC. Arturo Ignacio Branger Curiel, Director de la empresa Pasteurizadora Táchira C.A persona visionaria, quien apoyo y aprobó la asignación de recursos financieros necesarios para la ejecución del proyecto.

Al Ing. Jorge Alberto Osorio Barboza, Director ejecutivo de la empresa Pasteurizadora Táchira, siempre apoyo este proyecto.

A la empresa Pasteurizadora Táchira y al personal de los laboratorios de Físicoquímico donde se realizaron todos los análisis físicoquímicos, al laboratorio de microbiología donde se realizaron las fermentaciones y análisis microbiológicos, al Ing. Ramón Castillo gerente de la UEN Planta, Ing. Carolina Osorio gerente de Control de Calidad, Lic. Giovanna Romero gerente de Talento Humano.

A la Universidad del Táchira y en especial al personal del laboratorio de Fitoquímica, donde se realizaron las destilaciones y determinaciones de contenido de etanol por cromatografía de gases.

A mi familia, por el apoyo que me brindaron durante todos estos años de trabajo y en especial a mi Padre Don Antonio Valero Betancor Delgado, presente en mi vida, en mi carácter y forma de enfrentar la vida, te extraño.

A todos, muchísimas gracias.

RESUMEN

Se evaluó el uso de permeados concentrados de suero de quesería como medio de fermentación para la producción de etanol alimentario a partir de sueros obtenidos de la fabricación de queso Mozzarella y Blanco Fresco marca Paisa, suministrados por la empresa Pasteurizadora Táchira C.A (San Cristóbal, Venezuela). Para ello se realizó una serie de experiencias donde se mezclaron diferentes proporciones de permeados de sueros de quesería con el objetivo de obtener un permeado concentrado con unas características fisicoquímicas adecuadas para el crecimiento de levaduras productoras de etanol, sometiendo los permeados de sueros de quesería a un proceso de ultrafiltración con la finalidad de reducir la cantidad de proteína, seguido de una hidrólisis de la lactosa presente en el permeado utilizando la enzima β -galactosidasa, obteniendo un jarabe rico en glucosa y galactosa que son azúcares fermentables. Posteriormente los permeados se concentraron por evaporación, obteniéndose un permeado concentrado de suero de quesería con un pH de $4,86 \pm 0,10$ y $31,56 \pm 2,48\%$ de azúcares reductores. El permeado concentrado fue ajustado a diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%) con la finalidad de evaluar el efecto del NaCl sobre la producción de etanol y consumo de azúcares reductores durante la fermentación por diferentes levaduras. En las pruebas de fermentación, en una etapa preliminar, se utilizaron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Levapan[®], *Saccharomyces bayanus* Fermiline Tipicity[®] y *Kluyveromyces marxianus* ATCC[®] 36142TM durante 5 días de fermentación bajo condiciones anaeróbicas y temperatura controlada de 32 ± 1 °C, siendo la *K. marxianus* la levadura con menor producción de etanol y consumo de azúcares reductores, sobre todo cuando se incrementó la concentración de NaCl en el medio de fermentación, por lo que fue descartada en estudios posteriores. Las pruebas de fermentación finales fueron realizadas con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, observándose que en un medio de fermentación sin adición de NaCl, ambas levaduras consumieron cantidades similares de azúcares reductores entre los días 1 y 5, no existiendo diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Con respecto a las cantidades obtenidas de etanol producido en este medio de fermentación, aunque *S. cerevisiae* produjo concentraciones más elevadas respecto de *S. bayanus*, estas diferencias no fueron significativas ($p \geq 0,05$). Así mismo, el incremento en la concentración de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación hizo disminuir de manera significativa ($p \leq 0,05$) la producción de etanol de

S. bayanus, mientras que *S. cerevisiae* solo fue afectado de manera significativa cuando el medio fue adicionado del 2% de NaCl. No existieron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en la producción de etanol entre levaduras para las diferentes concentraciones de NaCl ensayadas, excepto cuando el medio fue adicionado de 1% de NaCl, presentando *S. cerevisiae* concentraciones de etanol superiores ($p \leq 0,05$) en el quinto día de fermentación respecto a *S. bayanus*. En relación a los parámetros cinéticos de productividad volumétrica y cantidad de etanol por gramo de azúcares reductores, en general *S. bayanus* obtuvo resultados cinéticos similares a los obtenidos con *S. cerevisiae* en fermentaciones realizadas con los diferentes permeados concentrados de suero de quesería, observándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre levaduras solo para el parámetro de productividad volumétrica a los días 1 y 5 cuando el medio utilizado fue añadido con 1% de NaCl, siendo *S. cerevisiae* la levadura que obtuvo mayores productividades en comparación a *S. bayanus*. Finalmente se verificó la calidad de los destilados obtenidos de fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae* y *S. bayanus* a partir de los permeados fermentados, y se analizó la presencia de componentes por análisis cromatográfico GC-FID registrándose solo la presencia de etanol, y no evidenciándose formación de metanol. Estos resultados demuestran la calidad de los destilados obtenidos y cumplimiento de la norma venezolana COVENIN (1997) respecto a este coproducto de fermentación y su potencial uso en la formulación de bebidas alcohólicas.

ABSTRACT

The use of concentrated whey permeates was evaluated as a fermentation medium for the production of food grade ethanol from cheese wheys obtained from the manufacture of Mozzarella and Blanco Fresco Paisa brand, supplied by Pasteurizadora Táchira CA (San Cristóbal, Venezuela). In this sense, a series of experiences were carried out where different proportions of permeates from cheese wheys were mixed with the objective of obtaining a concentrated permeate with adequate physicochemical characteristics for the growth of ethanol producing yeasts, subjecting the permeates to a ultrafiltration process in order to reduce the amount of protein, followed by a lactose hydrolysis using the enzyme β -galactosidase, obtaining a syrup rich in glucose and galactose that are fermentable sugars. Subsequently, the permeate was concentrated by evaporation, obtaining a concentrated whey permeate with a pH of 4.86 ± 0.10 and $31.56 \pm 2.48\%$ of reducing sugars. The concentrated permeate was adjusted to different concentrations of NaCl (0, 1 and 2%) in order to evaluate the effect of NaCl on ethanol production and reducing sugars consumption during fermentation by different yeasts. In the fermentation tests, at a preliminary stage, the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* Levapan®, *Saccharomyces bayanus* Fermiline Tipicity® and *Kluyveromyces marxianus* ATCC® 36142TM were used for 5 days of fermentation under anaerobic conditions and controlled temperature of 32 ± 1 °C, with *K. marxianus* being the yeast with lower ethanol production and reducing sugars consumption, especially when the concentration of NaCl in the fermentation medium was increased, so it was ruled out in subsequent studies. The final fermentation tests were performed with the *S. cerevisiae* and *S. bayanus* yeasts, observing that in a fermentation medium without added NaCl, both yeasts consumed similar ($p \geq 0.05$) amounts of reducing sugars between days 1 and 5. With respect to the quantities obtained of ethanol produced in this fermentation medium, although *S. cerevisiae* produced higher concentrations related to *S. bayanus*, these differences were not significant ($p \geq 0.05$). Likewise, the concentration increase of NaCl (1 and 2%) in the fermentation medium significantly reduced ($p \leq 0.05$) the production of ethanol from *S. bayanus*, while *S. cerevisiae* was only significantly

affected when the medium was added with 2% NaCl. There were no significant differences ($p \geq 0.05$) in the production of ethanol between yeasts for the different concentrations of NaCl tested, except when the medium was added with 1% NaCl, with *S. cerevisiae* having higher ethanol concentrations ($p \leq 0.05$) on the fifth day of fermentation with respect to *S. bayanus*. In relation to the kinetic parameters studied (volumetric productivity and quantity of ethanol per gram of reducing sugars), in general *S. bayanus* obtained kinetic results similar to those obtained with *S. cerevisiae* in fermentations carried out with the different concentrated whey permeates, observing significant differences ($p \leq 0.05$) among yeasts only for the volumetric productivity parameter on days 1 and 5 when the medium used was added with 1% NaCl, with *S. cerevisiae* being the yeast that obtained higher productivity compared to *S. bayanus*. Finally, the quality of the distillates obtained from fermentations carried out with *S. cerevisiae* and *S. bayanus* was verified, and the presence of components analyzed by GC-FID chromatographic analysis, registering only the presence of ethanol, but not the methanol formation. These results demonstrate the quality of the distillates obtained and compliance with the Venezuelan COVENIN standard (1997) related to this fermentation co-product, and its potential use in the formulation of alcoholic beverages.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1	SUERO DE QUESERÍA COMO SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	2
1.1.1	Impacto ambiental del suero de quesería	2
1.1.2	Composición de los principales sueros y permeados de quesería	5
1.1.2.1	Sueros dulces	6
1.1.2.2	Sueros ácidos	8
1.1.2.3	Sueros salados	8
1.1.2.4	Permeados de suero	9
1.1.3	Componentes principales de los sueros y permeados de quesería	10
1.1.3.1	Proteínas de suero	10
1.1.3.2	Lactosa	12
1.1.3.3	Minerales	15
1.1.4	Aplicaciones del suero de quesería	15
1.1.4.1	Aislados y concentrados de suero en polvo	15
1.1.4.2	Tratamientos biológicos de sueros y permeados	16
1.1.4.2.1	Acido acético	16
1.1.4.2.2	Acido láctico	18
1.1.4.2.3	Bacteriocinas	19
1.1.4.2.4	Butanol	20
1.1.4.2.5	Enzimas	21
1.1.4.2.6	Etanol	22
1.1.4.2.7	Glicerol	23
1.1.4.2.8	Goma xantana	23
1.1.4.2.9	Proteína celular	24

1.1.4.3	Productos obtenidos por tratamientos químicos	25
1.2	PROCESOS DE FILTRACIÓN DEL SUERO DE QUESERÍA PARA LA OBTENCIÓN DE SUSTRATO PARCIALMENTE DESPROTEINIZADO	26
1.3	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA	29
1.4	LEVADURAS	31
1.4.1	Influencia del entorno	33
1.4.1.1	Carbohidratos y otras necesidades nutricionales	33
1.4.1.2	Temperatura y pH	36
1.4.1.3	Oxígeno	37
1.4.1.4	Concentración de cloruro de sodio	39
1.4.1.5	Etanol y otros coproductos	40
1.4.1.6	Otros factores	43
1.4.2	Levaduras productoras de etanol	45
1.4.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
1.4.2.2	<i>Saccharomyces bayanus</i> (<i>S. uvarum</i> , <i>S. oviformis</i>)	49
1.4.2.3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	50
1.5	BIORREACTORES	54
1.5.1	Biorreactores de flujo continuo perfectamente agitados	54
1.5.2	Biorreactores discontinuos de mezcla perfecta (<i>batch</i>)	56
1.6	SEPARACIÓN DEL ETANOL DURANTE LA DESTILACIÓN Y USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	59
1.6.1	Procesos tecnológicos para la obtención de etanol	59
1.6.2	Calidad del etanol obtenido	63
1.6.3	Usos del etanol	65
1.6.3.1	Industria alimentaria	65
1.6.3.2	Industria cosmética	67
1.6.3.3	Industria farmacéutica	68

1.6.3.4	Industria de energía como biocombustible	70
---------	--	----

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1	ANTECEDENTES	76
2.2	OBJETIVOS	77
2.3	PLAN DE TRABAJO	78

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	OBTENCIÓN DE SUEROS Y PERMEADOS EN PASTEURIZADORA TÁCHIRA C.A.	84
3.1.1.	Suero y permeado de suero dulce de queso Blanco fresco marca Paisa	84
3.1.2.	Suero y permeado de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco marca Paisa	85
3.1.3.	Suero y permeado de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	86
3.2	TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS	87
3.3	MEDIO DE FERMENTACIÓN	88
3.3.1	Proceso de ultrafiltración	88
3.3.2	Hidrólisis de lactosa	88
3.3.3	Concentración de permeados	90
3.3.4	Ajuste de contenido de sal y caracterización fisicoquímica de los concentrados	90
3.4	FERMENTACIÓN DE LOS CONCENTRADOS DE PERMEADOS DE SUERO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl	91
3.4.1.	Levaduras	92
3.4.2.	Preparación del inóculo	92
3.4.3.	Ensayos de fermentación	93
3.4.4	Destilación de los permeados fermentados	93
3.4.5	Parámetros cinéticos	94
3.4.5.1	Productividad de etanol (Q_p)	95

3.4.5.2 Rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$)	95
3.5 DETERMINACIÓN ANALÍTICAS FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS	96
3.5.1 Determinación de proteínas	96
3.5.2 Determinación de azúcares reductores	96
3.5.3 Determinación de contenido de grasa	97
3.5.4 Determinación de sólidos solubles mediante refractometría	98
3.5.5 Determinación de cloruros	98
3.5.6 Determinación de pH	99
3.5.7 Determinación de recuentos totales de levaduras	99
3.6 DETERMINACIÓN DE ETANOL Y METANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN A LLAMA (GC-FID)	100
3.6.1 Instrumentación	100
3.6.2 Estándar interno	100
3.6.3 Procedimiento de calibración	100
3.6.4 Curva de calibración	101
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
3.7.1 Análisis descriptivo	103
3.7.2 Análisis principal de los datos de fermentación	104
3.7.2.1 Evolución a lo largo de los días	104
3.7.2.2 Evaluación del efecto de concentración de la sal	104
3.7.2.3 Comparativa de las levaduras	105
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 PERMEADOS DE SUERO DE QUESERÍA Y MEDIO DE FERMENTACIÓN	108
4.1.1. Caracterización de sueros de quesería de Pasteurizadora Táchira C.A.	109
4.1.2. Caracterización de permeados de Pasteurizadora Táchira C.A.	112

4.1.2.1. Permeados de suero dulce de queso Blanco fresco	112
4.1.2.2. Permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco	114
4.1.2.3 Permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	116
4.1.3. Medio de fermentación	118
4.2 USO DE PERMEADOS CONCENTRADOS DE SUERO DE QUESERÍA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl (0, 1 y 2%) COMO MEDIO DE FERMENTACIÓN POR LAS LEVADURAS <i>Kluyveromyces marxianus</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y <i>Saccharomyces bayanus</i> EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL ETANOL	126
4.2.1. Ensayo preliminar de fermentaciones utilizando las levaduras <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces bayanus</i> con diferentes concentraciones de NaCl	127
4.2.2. Procesos de fermentación utilizando la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan® con diferentes concentraciones de NaCl	136
4.2.3. Proceso de fermentación utilizando la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity® con diferentes concentraciones de NaCl	148
4.2.4. Comparativa de los procesos de fermentación utilizando las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces bayanus</i> con diferentes concentraciones de NaCl	160
4.2.5. Calidad del etanol obtenido a partir de permeados concentrados de suero de quesería utilizando las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces bayanus</i>	171
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXOS	213

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Biorreactor integrado con sistema de membrana	3
2	Síntesis de la lactosa en la glándula mamaria	12
3	Ciclo metabólico de producción de ácido acético, etanol y ácido láctico	17
4	Principio básico de la operación de una membrana	27
5	Filtración convencional o perpendicular (a) y tangencial (b)	28
6	Sistema continuo de fermentación	55
7	Sistema discontinuo de fermentación	57
8	Línea de producción de etanol a partir de sueros/permeados de quesería	60
9	Columna de destilación fraccionada de uso industrial	62
10	Bebidas alcohólicas elaboradas con etanol obtenido a partir de suero de quesería	67
11	Esquema para la elaboración de perfumes a partir de etanol	68
12	Procesos de fabricación en la industria farmacéutica	69
13	Esquema de producción de bioetanol en la obtención de biocombustible	70
14	Desarrollo del mercado mundial de bioetanol	71
15	Esquema de producción de biodiesel a partir de etanol	73
16	Caracterización fisicoquímica de sueros de quesería producidos por Pasterizadora Táchira C.A.	78
17	Diagrama de flujo del proceso de elaboración del medio de fermentación	79
18	Levaduras y criterios de selección utilizados para la selección de las levaduras utilizadas en la producción de etanol a partir de permeados concentrados procedentes de suero de quesería	81
19	Esquema de producción de etanol con análisis realizados durante la fermentación	82
20	Etapas de la elaboración del medio de fermentación a partir de los permeados de suero de quesería	91
21	Esquema del equipo clásico con columna Vigreux para destilación fraccionada (A); Montaje realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la UNET (B)	94
22	Aspecto visual del medio de fermentación durante el proceso de concentración por evaporación de la mezcla de 85% permeado de	121

	suero ligeramente ácido de queso Mozzarella y 15% de permeado de suero dulce de queso Blanco ultrafiltrada en membrana e hidrolizada, en diferentes intervalos de tiempo (0, 30, 60 y 90 min)	
23	Efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) sobre la producción de etanol utilizando las levaduras <i>K. marxianus</i> ATCC® 36142™, <i>S. cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>S. bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	135
24	Evolución del pH en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>S. bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	161
25	Evolución de la concentración de azúcares reductores (AR) del medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>S. bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	162
26	Evolución de la concentración de etanol en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>S. bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	164
27	Evolución de la productividad de etanol (Q_p) en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>S. bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	167
28	Evolución del rendimiento de etanol en base a azúcares reductores ($Y_{E/S}$) en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras <i>S. cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>S. bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	169
29	Cromatogramas GC-FID de los destilados obtenidos de medios de fermentación en ausencia (a) o presencia de 1% (b) y 2% (c) de NaCl utilizando la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Fermiline Tipicity®	173
30	Cromatogramas GC-FID de los destilados obtenidos de medios de fermentación en ausencia (a) o presencia de 1% (b) y 2% (c) de NaCl utilizando la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> Fermiline Tipicity®	175

ÍNDICE DE TABLAS

1	Composición del suero de quesería	6
2	Composición de diferentes tipos de suero dulce según el tipo de queso	7
3	Propiedades físicas de la lactosa	13
4	Parámetros óptimos requeridos para maximizar la producción de etanol utilizando diferentes tipos de desechos alimentarios	34
5	Características deseables y no deseables para la selección de levaduras productoras de etanol	45
6	Propiedades y condiciones de fermentación para las levadura <i>S. bayanus</i> , <i>K. marxianus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	53
7	Obtención de etanol a partir de suero de quesería utilizando bioreactores continuos	56
8	Obtención de etanol a partir de suero de quesería utilizando bioreactores discontinuos	59
9	Levaduras utilizadas en las pruebas de fermentación del concentrado de permeados de suero de quesería	92
10	Condiciones de operación del GC-FID para la determinación del metanol y etanol	101
11	Volumen y masa de etano, metanol y 1-butanol absoluto para la preparación de soluciones estándar en 5 niveles de concentración	102
12	Composición de sueros de quesería elaborados por Pasteurizadora Táchira C.A.	110
13	Caracterización fisicoquímica de permeados de suero dulce de queso Blanco Paisa	113
14	Caracterización fisicoquímica de permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco Paisa	115
15	Caracterización fisicoquímica de los permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella Paisa	117
16	Mezclas realizadas de permeados de sueros dulces, dulces ácidos y dulces salados	119
17	Concentración en evaporador de la mezcla de 85% permeado de suero ligeramente ácido de queso Mozzarella y 15% de permeado de suero dulce de queso Blanco ultrafiltrada en membrana e hidrolizada	120
18	Composición de medio de fermentación en ausencia de NaCl	122
19	Composición del medio de fermentación con 1% de NaCl	124
20	Composición del medio de fermentación con 2% de NaCl	124

21	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC® 36142™ utilizando permeados concentrados en ausencia de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados	129
22	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC® 36142™ utilizando permeados concentrados con 1% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados	131
23	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC® 36142™ utilizando permeados concentrados con 2% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados	134
24	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan® utilizando permeados concentrados procedentes de sueros de quesería desproteinizados en ausencia de NaCl	138
25	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan® utilizando permeados concentrados con 1% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados	142
26	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan® utilizando permeados concentrados con 2% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados	144
27	Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan®	145
28	Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan®	146
29	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity® utilizando permeados concentrados procedentes de sueros de quesería desproteinizados en ausencia de NaCl	149
30	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity® utilizando permeados concentrados con 1% de NaCl	153

	procedentes de sueros de quesería desproteinizados	
31	Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity® utilizando permeados concentrados con 2% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados	156
32	Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	157
33	Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con la levadura <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	159
34	Efecto de la inclusión de NaCl (0, 1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores obtenidos con las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	165
35	Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> marca Levapan® y <i>Saccharomyces bayanus</i> marca Fermiline Tipicity®	170

ÍNDICE DE ECUACIONES

1	Ecuación de Gay-Lussac	31
2	Extracto seco de productos obtenidos durante la fermentación a partir de 100 g de glucosa y 0,5 g de aminoácidos	32
3	Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas	32
4	Ecuación de hidrólisis de lactosa	89
5	Productividad de etanol (Q_p , gramos etanol/L h)	95
6	Rendimiento de etanol ($Y_{p/s}$, gramos etanol/gramos azúcares reductores)	95
7	Azúcares reductores (%)	97
8	Determinación de cloruros (%)	99
9	Determinación de NaCl (%)	99
10	Ecuación de la línea recta	103

Abreviaturas

%	porcentaje
t	toneladas
kg	kilogramo
L	litro
mL	militros
vvm	volumen de aire por volumen de medio por minuto
g/L	gramos por litro
$[\alpha]_D^{20}$	grados de rotación específica
g/L h	gramos en una hora por litro
kg/m ³	kilogramos por metro cúbico
°C	grados centígrados
h ⁻¹	velocidad de dilución
μmoles	micromoles
°Gay-Lussac	grados Gay-Lussac
min	minutos
rpm	revoluciones por minuto
U/mg	unidades por miligramo
IU	unidades internacionales
IU/L h	unidades internacionales por litro hora
h	hora
OD ₆₀₀	densidad celular
g	gramos
Y _c	rendimiento de biomasa
GOS/min L	galacto-oligosacáridos por minuto litro
GOS/ min g	galacto-oligosacáridos por minuto gramo
nm	nanómetros
MPa	megapascal
Da	dalton
v/v	volumen sobre volumen
m/v	masa sobre volumen
g/L h	gramos por litro hora
g/g	gramo de producto por gramo de sustrato
mg/dL	miligramos por decilitro

Capítulo I

Introducción

1.1. SUERO DE QUESERÍA COMO SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El suero de quesería es el subproducto obtenido de la fabricación de queso, donde cerca del 80-90% de la leche es convertida en suero de queso después de la coagulación y separación de la cuajada (Carvalho *et al.*, 2013). También se ha definido de múltiples maneras como el líquido opaco, de color verdoso amarillento, turbio remanente de la separación de la cuajada cuando se convierte leche en queso, o como el residuo líquido obtenido cuando la caseína y la grasa son separados por coagulación de la leche, cuya composición es 70-75% de lactosa y 10-15% de proteínas solubles (Frigon *et al.*, 2007).

Durante el año 2019 se estima que la producción mundial de leche alcance los 859.000.000 t de las cuales 120.260.000 t se destinarán a la producción de queso a partir de leche descremada y entera de vaca, oveja y cabra, obteniéndose unos 14.431.260 t de queso y 105.828.740 t de suero líquido como subproducto de la elaboración de queso, siendo la Unión Europea el principal productor con 2.822.400 t de queso y 20.697.600 t de suero líquido, generando alrededor del 19,55% del suero líquido producido en el mundo (FAO, 2019).

En Sur América, Brasil ocupa el cuarto lugar con una producción de 760.000 t de queso y 6.840.000 t de suero líquido. Venezuela reportó durante el 2018 una producción de 156.580 t de queso y 1.409.220 t de suero líquido (FAO, 2019). La empresa Pasteurizadora Táchira durante el año 2018 elaboró 3.168 t de queso entre frescos, semi-madurados y madurados, generando 28.512 t de suero, lo que representa el 0,58% del suero anual producido en Venezuela.

1.1.1 Impacto ambiental del suero de quesería

Las industrias lácteas generan dos tipos de efluentes en volúmenes altos, como son el suero y las aguas de lavado, las cuales requieren ser tratadas previamente antes de ser vertidos en cuerpos de agua. Las aguas de lavado son efluentes que tienen diferentes características, dependiendo del producto obtenido (yogur, queso, mantequilla, leche, helados). Sin embargo, el manejo y condiciones de operación de los diferentes sistemas de limpieza integrados (*Cleaning-in-place*, CIP) influyen las características de los efluentes (Pattnaik *et al.*, 2007). La caracterización de los parámetros de las aguas de lavado en la industria

láctea muestra valores muy variables para la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) obteniendo valores de 0,1-100 g/L con un índice de biodegradabilidad de entre 0,4 y 0,8. La materia orgánica contenida proviene principalmente de los carbohidratos (lactosa) y proteínas (del suero) presentes en la leche. Adicionalmente, el contenido de grasa (0,1-10,6 g/L) y los sólidos suspendidos (0,1-22 g/L), también contribuyen en la materia orgánica de este subproducto. Los cambios en la naturaleza de los efluentes lácteos hacen del tratamiento de los efluentes una tarea difícil (Rivas *et al.*, 2011).

Una configuración eficiente para la separación de sólidos de las aguas residuales es la integrada por el sistema biorreactor de membrana (MBR) (Farizoglu *et al.*, 2007) (Figura 1). El uso de las membranas para separación de sólidos puede minimizar la principal desventaja de la sedimentación convencional cuando se trabaja con altas concentraciones de biomasa. Las aguas residuales tratadas quedan libres de sólidos y organismos infecciosos.

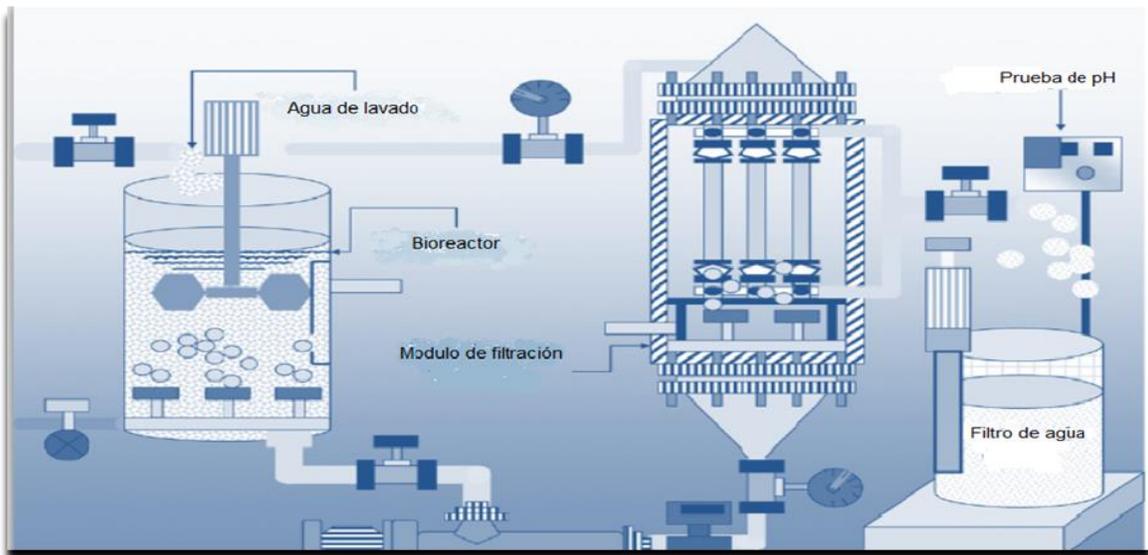


Figura 1. Biorreactor integrado con sistema de membrana.

Fuente: Farizoglu *et al.* (2007).

Con respecto al suero de quesería, las plantas que manejan grandes volúmenes de suero al día son las que pueden adquirir tecnologías como la de filtración tangencial, evaporadores y plantas de secado para su procesamiento, con la finalidad de obtener productos con alto

valor añadido que pueden ser comercializados y utilizados como ingrediente en la industria de alimentos, farmacéutica y de alimentos concentrados para animales, quedando las aguas residuales como el único efluente que debe ser tratado antes de ser vertido al drenaje.

Las empresas que manejan volúmenes bajos de leche no tienen la disponibilidad financiera para la adquisición y operación de equipos de filtración, evaporación y secado del suero, por lo cual el suero líquido se convierte conjuntamente con las aguas de lavado en un efluente que debe ser tratado antes de ser vertido al drenaje. La mezcla del suero líquido con las aguas de lavado resulta en una dilución del suero y reducción de la DBO a valores entre 2 y 4 g/L (Frigon *et al.*, 2007).

A modo de ejemplo, los productos orgánicos que generan los efluentes de una planta lechera que procesa 100 t de leche al día, producen tanta contaminación como los efluentes de una ciudad de 55.000 habitantes por día, por tanto, desde el punto de vista ecológico el suero debe ser tratado a fin de recuperar sus componentes orgánicos (Condor, 2000).

En la manufactura de quesos hay tres tipos principales de efluentes que contienen suero: el primero corresponde al suero resultante de la producción de queso por coagulación enzimática, ácida o mixta, el segundo suero de queso o permeado de suero, obtenido por floculación termoácida una vez extraído el requesón, y el tercer suero son las aguas de enjuague obtenidas del lavado de equipos y tuberías que contiene diferentes proporciones de suero de quesería (Leizaola, 2011; Carvalho *et al.*, 2013). Los efluentes representan un impacto ambiental significativo en la industria láctea porque contienen 0,4-10% de sólidos totales, 0,1-2,2 g/L de sólidos en suspensión, un pH de 3,3-9,0, fósforo (0,006-0,5 g/L), nitrógeno total por Kjeldahl de 0,01-1,7 g/L, y una carga orgánica de 0,6-102 g/L. El alto valor de materia orgánica es causado por la presencia de lactosa (0,18-60 g/L), proteína (1,4-33,5 g/L) y grasas (0,08-10,58 g/L) residuales, siendo esta materia orgánica 99% biodegradable (Ergüder *et al.*, 2001). El suero es el residuo más contaminante en la producción de queso (Rajeshwari *et al.*, 2000), y así representa un importante problema medio ambiental (Dragone *et al.*, 2011). Los sueros exhiben una DBO de 30-50 g/L y una demanda química de oxígeno (DQO) de 60-80 g/L, siendo la lactosa la principal responsable de estos altos valores de DBO y DQO. Los procesos de recuperación de la proteína soluble reducen el DQO en el suero en cerca de 10 g/L (Guimarães *et al.*, 2010).

Los sueros de quesería pueden causar un excesivo consumo de oxígeno, autroficación, impermeabilización y toxicidad en el ambiente que lo reciba. Los volúmenes de efluentes producidos en la industria quesera tienden a aumentar con el incremento en la producción de queso. En este contexto, puede referirse que, para la producción de 1 kg de queso, se requieren 10 L de leche, originando 9 L de suero.

1.1.2 Composición de los principales sueros y permeados de quesería

Como se ha comentado anteriormente, el suero de quesería es el líquido remanente de la coagulación de la leche en la producción de queso, después de la separación de la cuajada. Sus características corresponden a un líquido fluido de color amarillento, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco del 5,5 al 7% proveniente de la leche (Panesar *et al.*, 2007; Parra, 2009; Callejas *et al.*, 2012).

La composición del suero de quesería varía con la calidad y el tipo de leche usada (oveja, vaca, cabra y búfala), condiciones de cría, tipo de alimento y raciones utilizadas, estado de salud del animal y etapa de lactación (De Wit, 2001), y en definitiva de la composición de la leche utilizada de partida, pero también del tipo de queso a fabricar y del proceso tecnológico empleado en la fabricación del queso (Mollea *et al.*, 2013; Poveda, 2013; Ganju & Cogate, 2017). Dependiendo que la cuajada se consiga por acidificación o por adición de cuajo, se obtiene una variación importante en el contenido de las sales minerales (Cuartas, 2005). El suero dulce presenta un pH entre 5,9 y 6,6, y se obtiene por coagulación enzimática de la leche utilizando enzimas proteolíticas o cuajo, los cuales actúan sobre las caseínas de la leche, fragmentándolas y haciendo que éstas se desestabilicen y precipiten (Urtasun *et al.*, 2018). Los sueros ácidos se generan mediante la precipitación ácida de la caseína, la cual se logra disminuyendo el pH de la leche a 4,3-4,6. A este pH la mayoría de las caseínas alcanzan el punto isoeléctrico siendo su carga neta igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solo las proteínas de tipo séricas (Jovanovic *et al.*, 2005; Urtasun *et al.*, 2018). El suero salado se produce por la adición de NaCl a la leche de quesería o en la cuajada parcialmente desuerada durante la elaboración de algunas variedades de queso.

En la Tabla 1 se puede observar la composición promedio de cada uno de los tipos de sueros obtenidos del proceso de elaboración de quesos.

Tabla 1. Composición del suero de quesería.

Componente	Composición (%)		
	Suero dulce	Suero ácido	Suero salado ²
pH	> 6,7	< 5,6	>6,7
Sólidos totales	6,40	6,40	9,7
Agua	93,60	93,50	90,3
Grasa	0,05	0,04	0,4
Proteína	0,55	0,55	0,7
NNP ¹	0,18	0,18	-
Lactosa	4,80	4,90	4,8
Cenizas (sales minerales)	0,50	0,80	3,7
Calcio	0,043	0,12	0,04
Fósforo	0,040	0,065	-
Sodio	0,050	0,05	-
Potasio	0,16	0,16	-
Cloruro	0,11	0,11	-
Ácido láctico	0,40	0,40	0,40

Fuente: Tetra-Pak (2003).

¹NNP: Nitrógeno no proteico.

²Datos de Pasteurizadora Táchira C.A.

1.1.2.1 Sueros dulces

El suero dulce, obtenido por adición de cuajo (uso de la enzima quimosina) a la leche de quesería, tiene un pH cercano a la neutralidad y contiene poco calcio, ya que al pH de coagulación y desuerado no se produce la desmineralización de la micela de caseína. Hay gran variabilidad dentro de la composición de estos sueros, dependiendo del origen, y tratamientos tecnológicos a los que se somete la leche de quesería. Los sueros de queso contienen en promedio 5-6% de lactosa, 0,8-1,0% de proteína y 0,06% de grasa (Domingues *et al.*, 2001; Grba *et al.*, 2002; Kourkoutas *et al.*, 2002a; Silveira *et al.*, 2005; Zafar & Owais, 2006), aunque otros autores describen composiciones promedio en los sueros dulces ligeramente diferentes: lactosa (4,6-5,2%), proteínas (0,60-1,00%) y grasa (0,0-0,5%) (Panesar *et al.*, 2007; Callejas *et al.*, 2012).

En la Tabla 2 se presenta la composición de los sueros, según la tecnología quesera aplicada para la obtención de la cuajada: en dulces y salados obtenidos por coagulación enzimática de la leche, y ácidos obtenidos por coagulación ácido-láctica de la leche (uso de

cultivos) o adición de un acidulante (ácido acético, cítrico u otros de uso alimentario) que permita alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína (pH 4,6).

Tabla 2. Composición de diferentes tipos de suero dulce según el tipo de queso.

Autor	Composición	Tipo de queso
Gernigon <i>et al.</i> (2009)	Lactosa (%) = $4,48 \pm 0,01$ Proteínas (%) = $0,82 \pm 0,00$ pH = $6,52 \pm 0,01$	Queso tipo Suizo
Ramirez-Navas (2012)	Lactosa (%) = 4,70 Proteínas (%) = 0,8 Grasa (%) = 0,3 pH = 6,4-6,6	Queso Feta
Rivera <i>et al.</i> (2006)	Lactosa (%) = $4,78 \pm 0,08$ Proteínas (%) = $0,96 \pm 0,02$ Grasa (%) = $0,1 \pm 0,00$ Cenizas (%): $0,52 \pm 0,01$ pH = $6,54 \pm 0,03$	Queso Blanco Turrialba
Gernigon <i>et al.</i> (2009)	Lactosa (%) = $4,34 \pm 0,12$ Proteínas (%) = $0,89 \pm 0,05$ pH = $6,35 \pm 0,19$	Queso Cheddar
Ramirez-Navas (2012)	Lactosa (%) = 5,1 Proteínas (%) = 0,9 Grasa (%) = 0,3 pH = 6,4-6,6	Queso Camembert
Audic <i>et al.</i> , (2003)	Lactosa (%) = 4,9 Proteínas (%) = 0,9 Grasa (%) = 0,3 pH = 6,4-6,6	Queso fresco

Spălățelu (2012) realizaron una revisión sobre la valorización biotecnológica del suero, donde indicaron que los sueros dulces presentan valores de lactosa de 4,94%, proteínas de 0,88 %, grasa de 0,1 %, ácido láctico de 0,12 %, cenizas 0,52 % y pH de 6,7. En este estudio se evidencia que los valores de pH son similares a los de la leche, debido a que el suero cuando se recolecta y almacena no ha sufrido ningún proceso de acidificación por efecto de cultivos lácticos adicionados al queso ni por adición de sustancias acidulantes

como ácido cítrico, láctico o acético. Esta condición es deseable para las industrias queseras, por el aprovechamiento que pueden dar al suero dulce en procesos de secado como suero en polvo y obtención de subproductos como lactosa y proteínas.

Con respecto a la lactosa presente en sueros dulces, los valores reportados varían entre 4,5 y 5,0% para leche de vaca, las proteínas varían entre 0,7 y 0,8% principalmente proteínas de suero (0,7 %) y en una pequeña proporción caseínas y glicomacropéptidos (<0,1%).

1.1.2.2 Sueros ácidos

Entre los sueros ácidos encontramos los obtenidos del proceso de elaboración de quesos de pasta hilada, esencialmente a través de dos métodos: rápido donde se adiciona ácido cítrico a la leche con la finalidad de acidificar hasta un pH de 5,8 a 5,9, procediendo posteriormente a la coagulación enzimática, y el método tradicional donde se adiciona cultivos termófilos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus helveticus* hasta que la cuajada en suero alcance un pH de 5,2 a 5,4 para su hilado en salmuera con 20% NaCl con temperatura de 85 °C (proceso utilizado por Pasteurizadora Táchira). Antunes (2003) describió sueros ácidos con la siguiente composición: sólidos solubles $6,8 \pm 0,15$ °Brix, sólidos totales $6,5 \pm 0,15\%$, proteínas $0,85 \pm 0,05\%$, lactosa $4,94 \pm 0,47\%$, grasa $0,49 \pm 0,07\%$ y cenizas $0,57 \pm 0,03\%$. En el caso del suero obtenido por acidificación como en los quesos Cottage y Quark (con $\text{pH} < 5,0$ y donde se precipita la caseína al alcanzar el punto isoelectrico a pH de 4,6), el ácido láctico se convierte en lactato cálcico que aparece en el suero. Ramirez-Navas (2012) define los sueros ácidos como los obtenidos por coagulación ácida de la leche, hasta que alcance un pH entre 4,4 y 4,6 con la consiguiente separación de la cuajada del lactosuero ácido, cuya composición es la siguiente: lactosa 4,2%, proteínas 0,6-0,7%, materia grasa 0,1% y sales minerales 0,7-0,8%. Cuando la coagulación se realiza por acidificación de la leche empleando bacterias ácido lácticas o por agregado de ácidos orgánicos, se obtiene suero ácido con un pH que oscila entre 4,3 y 4,6 (Urtasun *et al.*, 2018).

1.1.2.3 Sueros salados

De acuerdo con la forma de incorporación de la sal a la cuajada, los sueros pueden también ser clasificados como salados, los cuales son obtenidos por la adición de 3,3-3,5% de NaCl en la tina de cuajado directamente a la leche de quesería o bien a una parte del suero

después del cortado o directamente a la cuajada una vez alcanzada la textura deseada (Pesta *et al.*, 2007). En queso Cheddar el proceso de salado se realiza directamente sobre la masa *cheddarizada* una vez cortada y previo al moldeado, generando por escurrido del queso entre un 2 y 5% de suero salado con una humedad de $87,6 \pm 5,8\%$, sólidos totales $12,4 \pm 5,9\%$, grasa $0,6 \pm 0,3\%$, proteína $0,6 \pm 0,2\%$ y sal $6,9 \pm 5,2\%$. En el caso del suero dulce procedente de queso Cheddar recogido previamente a la etapa de *cheddarización* que corresponde entre el 95 y 98% del suero total generado, este presenta la siguiente composición: humedad de $93,4 \pm 0,4\%$, sólidos totales $6,6 \pm 1,3\%$, grasa $0,2 \pm 0,1\%$, proteína $0,8 \pm 0,2\%$ y sal $0,2 \pm 0,1\%$ (Ezeji *et al.*, 2007). En la elaboración del queso Colby con un esquema de fabricación similar al del queso Cheddar, el suero salado presenta la siguiente composición: humedad $90,6 \pm 1,1\%$, sólidos totales $9,8 \pm 0,5\%$, grasa $0,8 \pm 0,4\%$, proteína $0,7 \pm 0,2\%$ y NaCl $4,0 \pm 0,6\%$ (Ezeji *et al.*, 2007). Otros valores promedios reportados en la bibliografía en porcentaje para el contenido de NaCl, grasa y humedad en sueros salados de quesos Cheddar y Colby son de 1,69, 8,71 y 82,2%, respectivamente, con porcentajes de proteína alrededor de 1% (Kapoor & Metzger, 2004).

1.1.2.4 Permeados de suero

Los permeados de suero son los residuos líquidos procedentes del proceso de desproteínización de los sueros, y están compuestos principalmente por 4,5-5,0% de lactosa, 0-0,1% de grasa, 0,52% de cenizas y aunque son desproteínizados, siempre contienen, según el procedimiento de extracción de la proteína, pequeñas cantidades de estas. Los permeados del suero se pueden obtener por tratamiento termoácido, donde se acidifica el suero y por efecto del calentamiento a $93\text{ }^{\circ}\text{C}$, la proteína de suero se desnaturaliza formando agregados proteicos que una vez separados y moldeados forman el requesón (Quintero *et al.*, 2001). La desproteínización es más efectiva utilizando el proceso de tratamiento termoácido junto al proceso de ultrafiltración tangencial que permite retener las proteínas en el retentado (Muñi *et al.*, 2005).

La aplicación de la tecnología de ultrafiltración por membrana a escala industrial en el fraccionamiento del lactosuero ha permitido la obtención de concentrados (retentados) con un alto contenido proteico que debido a sus propiedades funcionales y nutricionales son utilizados como sustitutos de alimentos proteicos, ya que contienen una proporción

importante de aminoácidos esenciales (Gunasekaran & Xiao, 2007). Estos concentrados proteicos se usan para enriquecer alimentos como pan, fideos, galletas, salsas, bebidas, guisos, helados, pasteles, alimentos para niños y algunos derivados de la leche. El otro subproducto importante del aprovechamiento de las proteínas del lactosuero, es el permeado obtenido durante la ultrafiltración, rico en lactosa y sales minerales que puede usarse para obtener lactosa con múltiples usos, en la producción de leches maternizadas mezclándolo con caseína, α -lactalbúmina (α -LA) y lactoferrina, o como medio de cultivo en procesos de fermentación para la producción de alcohol, levaduras y ácidos orgánicos. La lactosa puede recuperarse del permeado de la ultrafiltración aplicando tecnología de ósmosis inversa o nanofiltración (Quintero *et al.*, 2001; Muñi *et al.*, 2005).

1.1.3 Componentes principales de los sueros y permeados de quesería

1.1.3.1 Proteínas del suero

Las proteínas del suero de leche representan aproximadamente del 18 al 20% de las proteínas totales de la leche, sin embargo, son importantes desde el punto de vista nutricional, tecnológico y económico (Parra, 2009). Esta fracción contiene 4 tipos de proteínas mayoritarias: β -lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA), seroalbúmina (SA) e inmunoglobulinas (Igs). El suero presenta una compleja mezcla de proteínas globulares, cuya composición es ~ 50% de β -LG, ~20% α -LA, ~10% de Igs, ~6% de SA y otras proteínas y péptidos en cantidades menores, incluyendo lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y diversos factores de crecimiento (Qi & Onwulata, 2011).

La β -LG representa, aproximadamente, la mitad de las proteínas totales del suero de la leche de vaca, y está compuesta por 162 aminoácidos, 84 de los cuales son aminoácidos esenciales (Jovamovic *et al.*, 2005). El centro de la proteína es de carácter hidrofóbico, por lo que es capaz de fijar moléculas hidrófobas como colesterol y retinol. La β -LG es resistente a la digestión gástrica en algunos seres humanos, lo que origina intolerancia y/o alergenicidad. Sin embargo, tratamientos industriales como la esterilización, la aplicación de altas presiones hidrostáticas y la hidrólisis enzimática, mejoran la digestibilidad de la β -LG presente en el suero de quesería (Mollea *et al.*, 2013; Pescumma *et al.*, 2008).

La α -LA representa del 20 al 25% de las proteínas de suero de leche y contiene una gran variedad de aminoácidos, incluyendo aminoácidos de cadena ramificada y esenciales

(Walzem *et al.*, 2002). Se utiliza fracciones enriquecidas en α -LA purificada en las fórmulas infantiles para lactantes (Marshall, 2004). También presenta una gran afinidad por el calcio y otros minerales como zinc, manganeso, cadmio, cobre y aluminio (Parra, 2009).

La SA no es sintetizada en la glándula mamaria, procede de la sangre y es retenida cuando la sangre circula a través de la glándula mamaria. Este tipo de proteína se encarga de transportar sustancias de naturaleza química muy diversa, como ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, metales (como el calcio), y a nivel sanguíneo también numerosos fármacos, facilitando la transferencia de muchas de ellas desde la circulación sanguínea a órganos como el hígado, el riñón, el intestino, glándulas mamarias. La concentración de SA de leche aumenta durante la mastitis y durante la involución mamaria (Walzem *et al.*, 2002; Mollea *et al.*, 2013).

Las Igs son glicoproteínas con características de anticuerpos, existiendo cuatro clases en la leche: IgA, IgD, IgG e IgM. Las IgGs constituyen aproximadamente el 75% de los anticuerpos en un adulto, y se transfieren de la madre a la cría en el útero a través de la sangre y en la lactancia materna, sirviendo como una primera línea de defensas inmune para la cría, conocida como “inmunidad pasiva”. El calostro contiene concentraciones significativamente mayores de Igs, con respecto a la leche madura. Del mismo modo, la fracción del suero de leche contiene una cantidad significativa de Igs, entre 10 al 15% del total de las proteínas presentes (Marshall, 2004; Smithers, 2008; Mollea *et al.*, 2013).

La lactoferrina es un agente antioxidante no enzimático, encontrado en la fracción sérica de la leche, así como en el calostro. La lactoferrina del suero de la leche se compone de ~700 residuos aminoacídicos y de una cadena polipeptídica con dos sitios de unión para el transporte iones férricos. La concentración de lactoferrina en la leche y calostro bovinos es de aproximadamente 0,2 y 1,5 mg/mL, respectivamente (Walzem *et al.*, 2002; Marshall, 2004).

Las proteínas del suero se han utilizado durante muchos años como suplementos alimenticios de alto valor nutritivo debido a su capacidad para proporcionar aminoácidos esenciales. El valor biológico se refiere a la capacidad para proporcionar nitrógeno en un patrón equilibrado de aminoácidos esenciales y no esenciales (Jovamovic *et al.*, 2005). La proteína de suero de la leche posee el valor biológico más alto entre las proteínas (104-

120), con respecto a la caseína presente en la leche (77). Todos los marcadores de calidad proteica nutricional indican que la sustitución de la caseína por proteínas de suero de leche mejora la calidad proteica de las raciones (Van Dael *et al.*, 2005). El otro método de valoración a nivel nutricional de las proteínas es la relación de eficiencia proteica (PER), el cual determina la efectividad de una proteína a través de la medición del crecimiento animal. Esta técnica requiere alimentar a los animales con una biomolécula de prueba y luego medir la ganancia de peso en gramos por gramo de la misma consumida. Las proteínas de suero tienen un PER de 3,5 principalmente por presentar una concentración más elevada de aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina) que las caseínas (PER de 2,5) (Acevedo *et al.*, 2018).

1.1.3.2 Lactosa

La lactosa es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en todas las leches, y suele encontrarse en concentraciones comprendidas entre 45 y 50 g/L en leche de vaca. En la síntesis de la lactosa participan varios metabolitos como la propia glucosa o derivados de ésta, proceso que está regulado por un complejo enzimático conocido como lactosa-sintetasa (Figura 2), compuesto por la enzima galactosil transferasa que se encuentra en diversos tejidos y su coenzima α -LA que es una proteína sintetizada por las propias células epiteliales del tejido mamario. Es posible la síntesis de la lactosa en presencia de la enzima sin coenzima, pero la reacción exige entonces concentraciones elevadas de glucosa. La α -LA permite que se realice la reacción con cantidades de glucosa muy inferiores, por ello la tasa de síntesis de la lactosa está regulada por esta última (González *et al.*, 2007).

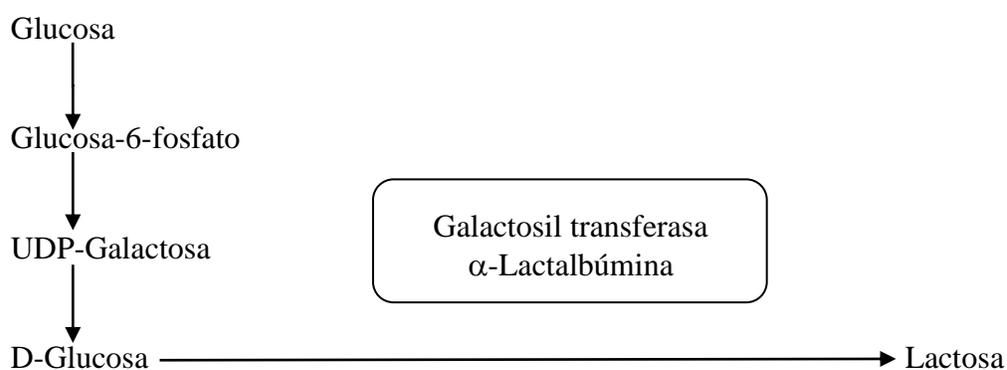


Figura 2. Síntesis de la lactosa en la glándula mamaria.

Fuente: Juca & Pérez (2010).

Químicamente la lactosa es un disacárido formado por D-glucosa y D-galactosa unidos por un enlace glicosídico β (1,4). Su peso molecular es de 342 daltons y su fórmula estructural es $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Ordoñez, 1998). La lactosa aparece en dos formas isoméricas, la α - y β -lactosa, ya que el grupo hemiacetal de la glucosa es potencialmente libre y puede existir como anómero α - y β -. La configuración del carbono anomérico (C1) de la lactosa no es estable y puede cambiar (mutarrotar) desde la forma α - a la β - y viceversa cuando el azúcar está en disolución. Cuando un isómero en concreto es disuelto en el agua, se produce un cambio gradual de una forma a la otra hasta establecerse un equilibrio y recibe el nombre de mutarrotación. Estos cambios pueden observarse con un polarímetro midiendo el cambio de la rotación óptica, que en equilibrio es de $+55,4^\circ$ (Ordoñez, 1998). La Tabla 3 muestra algunas propiedades físicas de los isómeros de la lactosa.

Tabla 3. Propiedades físicas de la lactosa.

	Isómeros de la lactosa	
	α -	β -
Rotación específica $[\alpha]_D^{20}$	$+89,4^\circ$	$+35,0^\circ$
Temperatura de fusión	202°C	252°C
Concentración de equilibrio	37,3%	62,7%
Cristalización de las soluciones saturadas:		
Por encima de $93,5^\circ\text{C}$		β -anhidra
Por debajo de $93,5^\circ\text{C}$	α -hidratada	

Fuente: Ordoñez (1998).

La lactosa tiene un débil sabor dulce, siendo su poder edulcorante de 0,25 con respecto a la sacarosa (Carbajal, 2013). El sabor dulce de la lactosa queda enmascarado por la caseína, por lo que el suero tiene un sabor más dulce que la leche de la que proviene.

Las condiciones de cristalización influyen en la forma de los cristales, siendo la lactosa un claro ejemplo de polimorfismo cristalino. La cristalización es un proceso lento y los cristales formados son duros y poco solubles, y pueden detectarse en el paladar cuando su tamaño supera las $16\ \mu\text{m}$. La lactosa que se obtiene por cristalización por debajo de la temperatura crítica de $93,5^\circ\text{C}$, se encuentra bajo la forma de α -hidratada ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$),

y la forma β -anhidra cristalizada de las soluciones concentradas a una temperatura superior a 93,5 °C. Cuando la lactosa está convenientemente cristalizada posee muy baja higroscopicidad, haciendo de ella un azúcar atractivo en el glaseado de diferentes productos.

Veysseyre (1980) indicó que la solubilidad de la lactosa es baja (17 g/100 mL de agua a 15 °C) en comparación con la de otros azúcares, siendo unas diez veces menor que la de la sacarosa, pero puede llegar a hacerse sobresaturada antes de que ocurra una cristalización espontánea. Las lactosas α - y β - tienen una solubilidad muy diferente ($\beta \gg \alpha$) y una dependencia de la temperatura muy distinta ($\alpha \gg \beta$). La solubilidad depende en parte del equilibrio de la mutarrotación, la velocidad de disolución y de la velocidad de mutarrotación, siendo la solubilidad final la misma cuando se disuelve lactosa α - o β - ($\beta/\alpha = 1,63$ a 15 °C).

Existen dos formas de hidrolizar la lactosa para obtener glucosa y galactosa: vía química y vía enzimática. En presencia de ácidos inorgánicos la lactosa se hidroliza dando lugar a una mezcla equimolecular de sus dos azúcares. El ácido más utilizado en esta aplicación ha sido el clorhídrico ya que en igualdad de condiciones proporciona una velocidad de hidrólisis mayor que la del ácido sulfúrico, si bien este último tiene la ventaja de poder ser eliminado del hidrolizado mediante precipitación con hidróxido cálcico. Sin embargo, esta vía de hidrólisis de la lactosa hoy en día está en desuso ya que presenta grandes limitaciones para poder ser aplicada como la eliminación previa de las proteínas y posterior del catalizador ácido empleado.

El abaratamiento de los costos en los procedimientos de aislamiento y producción de la lactasa ha hecho viable el paso del uso de estas enzimas desde el laboratorio a su aplicación a gran escala. La β -galactosidasa es la principal enzima responsable de esta hidrólisis. Se trata de una oxidasa que rompe el enlace β -1,4-glicosídico liberando glucosa y galactosa. Esta enzima es utilizada durante la preparación de medios de fermentación a partir de la lactosa, con la finalidad de obtener glucosa y galactosa que pueden ser utilizados por las levaduras para la producción de diferentes metabolitos como el etanol, CO₂ y masa celular.

1.1.3.3 Minerales

La cantidad de minerales varía según el tipo de suero, siendo los sueros dulces los que tienen cantidades menores con respecto a los ácidos. Los sueros dulces contienen en promedio entre 0,4 y 0,5% de minerales, y los sueros ácidos entre 0,7 y 1,0%, valores similares a los contenidos en la leche (0,7-1,0%) y relacionados con la desmineralización de la cuajada por efecto de la acidez. El suero dulce de queso Emmental tiene en promedio 0,5% de sales minerales, 0,6% el de queso Camembert y 0,5% los de los quesos Cheddar y Feta (Ramirez-Navas, 2012).

En los sueros ácidos obtenidos por coagulación ácido-láctica de la leche, se produce desmineralización en la cuajada, por lo cual el suero tiene una mayor cantidad de calcio y fósforo que los sueros dulces. Antunes (2003) indicó que los sueros ácidos tienen valores de 0,045% de calcio y 0,04% de fósforo. El contenido de potasio (1,4-1,6 g/L) y cloruros (2,0-2,2 g/L) está dentro del mismo intervalo que los sueros dulces (Callejas *et al.*, 2012).

1.1.4 Aplicaciones del suero de quesería

Son variadas las posibilidades de aprovechamiento del suero de quesería, entre las que cabe mencionar: (1) valorización de su parte proteica con membranas de ultrafiltración, ultrafiltración-diafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis, evaporadores y plantas de secado, en la producción de diferentes productos de gran valor añadido como los concentrados y aislados de proteínas del suero en polvo; (2) aplicación de tratamientos biológicos con la finalidad de obtener metabolitos como los ácidos acético, cítrico y láctico, bacteriocinas, enzimas como la β -galactosidasa, y otros metabolitos de interés como butanol, etanol, glicerol, goma de xantana, y proteína unicelular, entre otros; (3) aplicación de tratamientos fisicoquímicos para la obtención de lactulosa, lactitol, ácido lactobiónico, lactosil urea, galacto-oligosacáridos y lactosucrosa.

1.1.4.1 Aislados y concentrados de suero en polvo

La producción de aislados y concentrados con 35 a 85% de proteínas del suero con respecto a los sólidos totales, corresponde a una de las aplicaciones más utilizada, y está basada en la aplicación de tecnologías de valorización utilizando membranas de ultrafiltración, ultrafiltración-diafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis, evaporadores y plantas de secado (Zadow, 2003; Gonzalez *et al.*, 2007; Pouliot, 2008; Urtasun *et al.*,

2018). Estas tecnologías fueron desarrolladas para elaborar productos con alto valor comercial, no perecederos, como proteínas, lactosa, suero en polvo, concentrados de proteínas de suero al 34 y 80%, suero en polvo desmineralizado, aislados proteicos con 90% de proteína, y permeado en polvo (Foegeding & Luck, 2002). Los procesos de valorización constituyen la opción preferencial para el tratamiento de este producto (Muñi *et al.*, 2005; Panesar *et al.*, 2007; Spălățelu, 2012).

1.1.4.2 Tratamientos biológicos de sueros y permeados

Los procesos biológicos pueden ser utilizados también como las tecnologías para la obtención de productos de alto valor añadido. Por ejemplo, la hidrólisis de la lactosa y proteínas conduce a la generación de los monosacáridos de lactosa (glucosa y galactosa), péptidos y/o aminoácidos, respectivamente. Los procesos de fermentación controlada están siendo considerados en la producción de ácidos, enzimas y otros metabolitos de interés que a continuación se describen.

1.1.4.2.1 Ácido acético

Las bacterias acéticas son microorganismos aerobios estrictos, están incluidas dentro de las Alphaproteobacterias y tienen la habilidad de oxidar fuentes de carbono como el etanol a ácido acético (Adachi *et al.*, 2003). El ácido acético es el principal metabolito de las bacterias acéticas y se produce a partir de la bioconversión del etanol a través de dos reacciones catalizadas por la pirroloquinolona quinona dependiente de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. La enzima alcohol deshidrogenasa oxida el etanol a acetaldehído, que luego se convierte en ácido acético por la aldehído deshidrogenasa y se libera en el entorno circundante (Figura 3). Estos dos complejos de deshidrogenasa están estrictamente conectados a la cadena respiratoria, que transfiere electrones a través de la ubiquinona al oxígeno, que actúa como aceptor final del electrón (Matsuchita *et al.*, 2004).

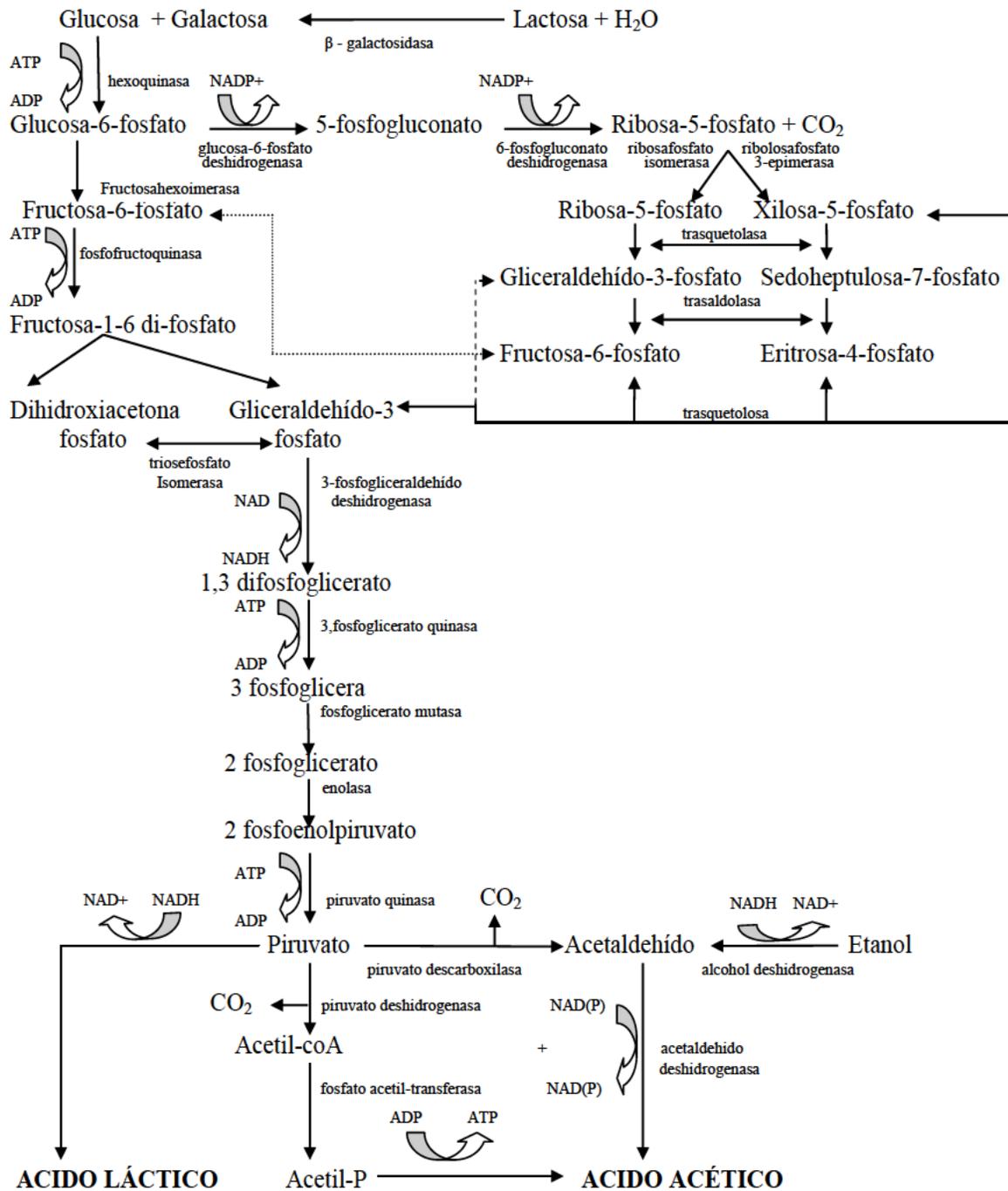


Figura 3. Ciclo metabólico de producción de ácido acético, etanol y ácido láctico.
Fuente: Nielsen *et al.* (2003).

El proceso de producción de ácido acético está dividido en 3 etapas: la primera etapa consiste en el inóculo y crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y fermentación con producción de etanol en un tiempo de fermentación de 24 h, a una temperatura de

fermentación a 32 °C y aireación a 0,2 vvm; en la segunda etapa se prepara e inocula un cultivo mixto de *S. cerevisiae* (16%) y *Acetobacter pasteurianus* (0,06%) con un tiempo de fermentación de 48 h, temperatura de 34 °C y aireación a 0,4 vvm; en la tercera etapa *A. pasteurianus* produce ácido acético en un tiempo de fermentación de 72 h, una temperatura de 34 °C, y aireación a 0,2 vvm. El promedio de producción de ácido acético es de 52,51 g/L bajo condiciones óptimas cuando la concentración inicial de glucosa es de 90 a 120 g/L (Whang *et al.*, 2013).

Entre otros, los permeados de suero de leche y de queso se pueden utilizar como materia prima para la producción de ácido acético, para lo cual la lactosa debe ser hidrolizada en glucosa, que a su vez se cataboliza a través de la vía hexosa monofosfato (Baena-Ruano *et al.*, 2010) para obtener piruvato, que produce etanol a través de acetaldehído. Finalmente, el etanol se convierte en ácido acético por dos enzimas activas (alcohol y aldehído deshidrogenasas). *Acetobacter* es un género de bacterias aeróbicas y durante la fase de crecimiento exponencial, la demanda de oxígeno es muy alta para conseguir un mayor rendimiento y productividad de ácido acético. El nivel de oxígeno disuelto se debe mantener en 17 g/L a través de la aireación estéril continua para facilitar la producción incesante de ácido acético. El pH óptimo para la oxidación a ácido orgánico es 6 y *Acetobacter* es ácido tolerante para crecer y oxidar hidratos de carbono, incluso a nivel de pH bajo de 3,5 a 4,0 (Baena-Ruano *et al.*, 2010).

Otros microorganismos diferentes de *Acetobacter* también son capaces de producir ácido acético. Pruebas realizadas con *Kluveromyces fragilis* utilizando la levadura en suero salado con 52 g/L de lactosa, 8% de NaCl y 3% Na₂SO₃ y pH del medio ajustado a 8,5 a una temperatura de fermentación de 32 °C, bajo condiciones anaeróbicas y agitación a 120 rpm por un tiempo de 192 h, mostraron una producción de 0,322 g de ácido acético por gramo de lactosa (Mostafa, 2001).

1.1.4.2.2 Ácido láctico

El ácido láctico es uno de los productos obtenidos de la fermentación del suero de quesería y es utilizado por las industrias química, farmacéutica y de alimentos, así mismo se reporta su uso como sustrato para la producción de algunos ácidos orgánicos (Lindquist, 1992), y en la obtención de plásticos biodegradables como los polilactato y ácido poliláctico que

exhiben excelentes propiedades equivalentes a los mejores plásticos obtenidos del petróleo (Eldeleklioglu *et al.*, 2013). Aproximadamente el 90% del ácido láctico producido anualmente en el mundo se obtiene por vía fermentativa (Boontawan *et al.*, 2011), utilizando diferentes cepas de *Lactobacillus* sp. y algunos *Streptococcus* sp. para su producción (Norton *et al.*, 1994). *Lb. helveticus* es uno de los microorganismos termófilos y acidificantes más utilizados a nivel industrial para la producción de ácido láctico, por su capacidad de procesar la lactosa bajo condiciones extremas (Norton *et al.*, 1994). El proceso de transformación de la glucosa en ácido láctico se describe en la Figura 3.

Tango & Ghaly (1999) estudiaron el uso de diferentes niveles de micro aireación (0,00; 0,05; 0,010 y 0,15 vvm) como factor de crecimiento de *Lb. helveticus* para la producción de ácido láctico, a partir de concentraciones iniciales de lactosa de 50, 75 y 150 g/L, pH de 5,5 y temperatura de fermentación de 42 °C. Los resultados indicaron que una micro aireación de 0,10 vvm y una concentración inicial de 75 g/L de lactosa corresponde al mejor tratamiento, donde se logra la mayor cantidad de células de levadura (ufc/mL) y la mayor producción de ácido láctico (51 g/L), obteniéndose un rendimiento del 68%. El efecto del pH y temperatura de fermentación en la producción de ácido láctico a partir de suero de leche utilizando *Lb. helveticus* ha sido estudiado por Soriano *et al.* (2012) observando que un pH de 5,9 y una temperatura de 42 °C permiten obtener un rendimiento del 98% de conversión de lactosa en ácido láctico. Por otro lado, pruebas realizadas utilizando como sustrato lactosuero desproteinizado con 4,8% de lactosa, suplementado con fosfato de amonio y extracto de levadura a una temperatura de fermentación de 40 °C durante un tiempo de 72 h y utilizando *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* obtuvo 36,7 g/L de ácido láctico (Rojas *et al.*, 2015). Eldeleklioglu *et al.* (2013) obtuvieron un rendimiento de 62% en la producción de ácido láctico (36 g/L) a partir de una concentración inicial de 57 g/L de lactosa, temperatura de fermentación 28 °C, con tiempo de fermentación de 48 h utilizando la cepa NRRL-1922 de *Lb. casei*.

1.1.4.2.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por algunas bacterias ácido-lácticas y presentan un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Actualmente, las bacteriocinas son utilizadas en una amplia categoría de

alimentos incluyendo cárnicos, lácteos, productos enlatados, productos del mar, vegetales, jugos de frutas, y bebidas como cerveza y vino. Sus características de compatibilidad en dichos productos, así como su modo de acción hacen atractivo su uso en los alimentos (Beristain-Bauza *et al.*, 2012). La nisina (polipéptido) es una bacteriocina que se ha utilizado en la producción de los quesos. Se usa como conservante, actuando contra las bacterias Gram-positivas que deterioran los alimentos. Al ser una proteína, es tratada por el cuerpo como tal y digerida en el intestino delgado. Liu & Fan (2004) obtuvo nisina (30 kg/m^3) a partir de *Lactococcus lactis*, en un biorreactor de lecho empacado (pH 5,5 y $31 \text{ }^\circ\text{C}$), utilizando permeado de suero. Su estudio ilustra la posibilidad de una producción continua con una alta concentración de bacteriocina por bacterias ácido-lácticas para uso como bioconservantes alimentarios. Otro caso de obtención de bacteriocinas a partir de permeado de suero lo reportan, Cladera-Olivera *et al.* (2004) quienes trabajaron con *Bacillus licheniformis* a pH inicial entre 6,5 y 7,5 y temperatura entre 26 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.1.4.2.4 Butanol

El suero de quesería representa una materia prima de interés para la producción de butanol por su alta disponibilidad, siendo un alcohol de interés para la industria química y como biocombustible al tener ciertas ventajas con respecto al etanol en mezclas con gasolina por su alto contenido de energía, baja miscibilidad con el agua y baja volatilidad (Bohlmann, 2007; Cascone, 2008). El butanol puede reemplazar la gasolina sin necesidad de modificar la tecnología de vehículos y motores. Para su producción se utilizan bacterias sacarolíticas productoras de ácido butírico (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. aurantibutyricum*). Las cepas son capaces de metabolizar una gran cantidad de sustratos: pentosas, hexosas, mono-, di- y polisacáridos (Flickinger & Drew, 1999; Liu & Fan, 2004).

El proceso de producción de butanol utilizando un reactor de lecho continuo se divide en 3 etapas realizadas a una temperatura controlada de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y sin presencia de oxígeno (Raganati *et al.*, 2013): (1) la acidogenosis donde se incrementa el pH a 5,5 y se utiliza un flujo de dilución continuo de $0,4 \text{ h}^{-1}$ con la finalidad de favorecer la fase de crecimiento celular y acidificación del medio, donde se forma una película de biofilm; (2) la solventogenosis que se produce a medida que disminuye el pH del medio ($<4,5$), el

metabolismo de la célula se desplaza hacia la producción de solvente; y (3) durante la tercera etapa las células se vuelven endosporas por las condiciones del medio, obteniéndose una productividad de 2,66 g/L h, concentración de 4,93 g/L y rendimiento de 0,26 g/g siendo este último valor muy bajo.

La producción industrial a través de la fermentación no se realiza por el alto costo de la materia prima, bajo rendimiento, baja productividad, baja concentración de butanol en el caldo y degeneración de cepas productoras de butanol (Kumar & Gayen, 2011). La baja concentración de butanol en caldo de fermentación hace que su recuperación y concentración sea costosa (Liu & Fan, 2004; Napoli *et al.*, 2012; Ezeji *et al.*, 2013).

1.1.4.2.5 Enzimas

Las enzimas proteolíticas son utilizadas en la hidrólisis de proteínas lácteas, con la finalidad de reducir los tiempos de maduración de los quesos, y para ello se emplean preparaciones enzimáticas ricas en actividades aminopeptidasa, las cuales son obtenidas a partir de la fermentación de lactosuero (Choi *et al.*, 1996). También la producción de α -amilasa usando cepas de *Bacillus subtilis*, está influenciada por la naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno produciéndose grandes concentraciones de esta enzima en un medio que contenga lactosa como los sueros de quesería (Mawson, 2003).

La β -galactosidasa, como se ha comentado anteriormente, es una enzima que hidroliza la molécula de lactosa en sus correspondientes monosacáridos, glucosa y galactosa, y es utilizada ampliamente en la elaboración de productos en la industria láctea (Araujo *et al.*, 2007), como dulce de leche (evita la cristalización de la lactosa) y en leches deslactosadas, que corresponde a un mercado en crecimiento, ya que hay que tener en cuenta que el 70% de la población mundial es intolerante a la lactosa. La β -galactosidasa o lactasa puede ser producida y caracterizada a partir de cepas de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado (Ramírez & Rivas, 2003). Un ejemplo de producción de esta enzima a partir de suero de quesería (4,4% de lactosa) es el realizado por Bansal *et al.* (2008) utilizando la levadura *K. marxianus* MTCC 1389 por un tiempo de 72 h a una temperatura de 28 °C, agitación a 100 rpm, siendo extraídas las enzimas mediante la aplicación de 4 métodos diferentes (sonicación, homogenización y utilizando solventes como sodio dodecilsulfato (SDS)-cloroformo, o tolueno), destacando que el mejor método de

extracción el sistema SDS-cloroformo, donde se obtuvo 1,68 U/mg y una actividad específica de la proteína de 59 U/mg. Rajoka *et al.* (2003) trabajaron en la producción de β -galactosidasa a partir de diferentes medios de fermentación con 2% de sustrato, evaluando lactosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, sucrosa y glucosa como sustratos. Estos autores obtuvieron la mayor productividad volumétrica ($Y_{\beta\text{-galactosidasa/Lactosa}}$) de 80 IU/ L h a partir de lactosa, seguido de la galactosa, con la que se consiguió un rendimiento $Y_{\beta\text{-galactosidasa/Galactosa}}$ de 71 IU/ L h. En todos los ensayos se utilizó un intervalo de temperatura óptima de fermentación entre 35 y 37 °C, consiguiéndose la mayor actividad de producción de la enzima β -galactosidasa entre las 30 y 40 h desde el inicio de fermentación, cuando se adiciona la levadura *K. marxianus*. Araujo *et al.* (2007) describieron el efecto de la concentración de lactosa (4,76; 8,50 y 12,6%) sobre la cinética de crecimiento de *K. marxianus var. marxianus* y la producción de β -galactosidasa. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 150 rpm en un bioreactor Bioflo 4000 a pH de 5,0 y temperatura de 35 °C, donde la máxima actividad se obtuvo en el suero sin concentrar (4,72%) y fue $384,42 \pm 13,11$ $\mu\text{moles de ONP/L 5 min}$.

1.1.4.2.6 Etanol

Es una de las sustancias más utilizadas y producidas en el mundo, y sus usos abarcan diferentes aplicaciones, siendo la más importante como combustible para motores de combustión interna (bioetanol y biodiesel), como solvente en la industria química y cosmética, solvente y antiséptico (70 °Gay-Lussac) en la industria farmacéutica y en la industria de alimentos es el ingrediente principal en la elaboración de bebidas alcohólicas para consumo humano. El etanol se puede obtener a través de dos vías: por rutas químicas (hidratación catalítica del etileno) o biotecnológicas (fermentación alcohólica) que corresponde a un proceso anaeróbico realizado por levaduras, entre las que se encuentran *Candida pseudotropicalis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, y algunas clases de bacterias como *Escherichia coli*. Entre los sustratos más utilizados cabe mencionar: glucosa, galactosa, lactosa, trehalosa, melobiosa, xilosa, fructosa, sacarosa, maltosa y almidones, entre otros (Bai *et al.*, 2008). Durante la fermentación con levaduras la glucosa obtenida de la hidrólisis de la lactosa, en su mayoría es transformada principalmente en etanol y dióxido de carbono, con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos NADH/NAD⁺ y

NADHP/NADP⁺ y enlaces de alta energía de fosfato, ATP. La energía se sintetiza como ATP a partir de un proceso de glicólisis al que sigue el metabolismo del piruvato (Figura 3). De este modo la fermentación complementa la glucólisis y hace posible la producción de energía en ausencia de oxígeno (Nielsen *et al.*, 2003). La obtención de etanol es el objetivo principal del presente trabajo y en secciones posteriores se ampliará los procedimientos de obtención de este metabolito, describiendo los procedimientos de preparación de sustrato, utilización de enzimas, levaduras, condiciones de fermentación y parámetros cinéticos utilizados para medir la eficiencia durante la fermentación. De las propiedades fisicoquímicas del etanol, las más importantes para ser usadas en el presente trabajo son: punto de ebullición de 78,3 °C, densidad (20 °C) de 0,806 g/L, grado alcoholimétrico de 96 ° y es soluble en agua. Destilerías de lactosuero están en operación en Irlanda, Nueva Zelanda, y los Estados Unidos.

1.1.4.2.7 Glicerol

El glicerol es un compuesto ampliamente utilizado en la industria cosmética (como ingrediente de crema dental, crema humectante y acondicionador para cabello), y en la industria farmacéutica. Rapin *et al.* (1994) obtuvieron glicerol a partir de permeados de suero de quesería suplementados con 1% Na₂SO₃ y usando durante la fermentación la levadura *K. fragilis*, obteniendo un rendimiento óptimo de 11,6 kg/m³. Al utilizar la levadura *K. marxianus* en la fermentación, las condiciones óptimas para obtener un rendimiento del 9,5% de glicerol (en peso de lactosa) son de 30 a 37 °C y pH de 6 a 7. Mostafa (2001) trabajó con una cepa de *K. fragilis* (CBS397) en suero de quesería con 7,5% de NaCl y pH ajustado a 7, al que se adicionó 1% Na₂SO₃ y se mantuvo en agitación continua durante 60 h a una temperatura de fermentación de 37 °C, obteniéndose 1,27% de glicerol.

1.1.4.2.8 Goma de xantana

La goma de xantana es un heteropolisacárido soluble en agua compuesto de glucosa, manosa y ácido glucónico. Es un producto obtenido industrialmente de la fermentación de la glucosa y sacarosa, utilizando la bacteria gran negativa *Xanthomonas campestris* (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000). La goma de xantana es utilizada en la industria química, farmacéutica y en la industria de alimentos como estabilizante en la elaboración de bebidas,

panadería y alimentos preparados, por la alta viscosidad utilizando bajas concentraciones que desarrolla en soluciones acuosas. El costo principal para su producción es la materia prima, por lo cual se han evaluado otras fuentes de carbono como el suero de quesería por su bajo costo y alta disponibilidad. Fernandes Silva *et al.* (2009) utilizando un medio de fermentación con 44,8 g/L de lactosa, 2% de KH_2PO_4 y 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y un inóculo al 20% de una cepa de *X. campestris* 1230 de la colección de cultivos de fitobacterias del Instituto de Biología de Campinas (Brasil), obtuvo una máxima producción de 25 g/L de goma de xantana después de 72 h de fermentación a una temperatura de 28 °C con agitación a 180 rpm, y pH de 7,2 (rendimiento de 55,5%). Niknezhad *et al.* (2015) trabajó con 5% de un inóculo de *X. campestris* el cual se adicionó a una solución de 50 mL, compuesta de 2 g/L de NH_4NO_3 , 2 g/L ácido cítrico, 0,006 g/L de H_3BO_3 , 0,006 g/L de ZnCl_2 , 0,0024 g/L de FeCl_3 y 0,02 g/L de CaCl_2 . A cada uno de los frascos se le adicionó 8% de suero en polvo de quesería con la finalidad de alcanzar una concentración de 4,8% de lactosa, 1,5% de KH_2PO_4 y 0,18% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Los frascos fueron incubados a 28 °C con agitación a 250 rpm, durante un tiempo de fermentación de 48 h, obteniéndose 1,67% de goma de xantana extraída por precipitación, al adicionar una solución de CaCl_2 en isopropanol.

1.1.4.2.9 Proteína unicelular

La producción de levaduras a partir del suero de quesería es una alternativa para la obtención de proteínas unicelulares, que son comercializadas para consumo humano o alimentación animal. El proceso de producción de levaduras incluye cuatro etapas: (1) la fase de latencia donde la levadura se adapta al medio de fermentación; (2) la fase exponencial de crecimiento realizada bajo condiciones aeróbicas, donde se produce suficiente energía para el crecimiento celular; (3) la fase estacionaria donde hay agotamiento del sustrato; y (4) la fase de muerte celular (Ghaly *et al.*, 2005).

Ghaly *et al.* (2005) utilizaron un proceso de flujo continuo bajo condiciones aeróbicas usando la levadura *K. fragillis* y reportaron que la fermentación 1 g de lactosa requiere 0,08 g de O_2 y 0,09 g de NH_4 para producir 0,79 g de células, 0,11 g de CO_2 , 0,26 g de H_2O , 0,005 g de H y 82,5 J de energía, con un rendimiento de 0,79 g de células por gramo de lactosa consumida. Quintero *et al.* (2001) estudiaron el cultivo continuo de la levadura *K.*

fragillis ATCC 8554 en suero dulce de leche desproteínizado a pH 5 y temperatura de 30 °C, obteniendo un rendimiento (Y_c) de $0,874 \pm 0,181$ kg de biomasa producida por kilogramo de lactosa consumida para crecimiento.

1.1.4.3 Productos obtenidos por tratamientos fisicoquímicos

Como se ha comentado anteriormente los sueros y permeados de quesería son ricos en lactosa. La lactosa, al igual que otros carbohidratos, posee en su molécula una serie de grupos reactivos tales como los grupos hidroxilos libres, el grupo reductor de la glucosa y la unión glicosídica que permiten llevar a cabo infinidad de transformaciones. Aunque las posibilidades de obtención de derivados de la lactosa por métodos fisicoquímicos son muy numerosas, solamente algunas de ellas han llegado a interesar desde un punto de vista de aplicación industrial, entre las que cabe citar la obtención de lactulosa, lactitol, ácido lactobiónico, derivados de urea (lactosill urea), galacto-oligosacáridos y lactosucrosa.

La lactulosa (4-0- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) es un disacárido utilizado para reducir el pH intestinal (prebiótico), mejorando la actividad microbiana en el intestino (*Lactobacillus* sp. o *Bifidobacteria* sp.), ayudando a la excreción fecal y por lo tanto alivia el estreñimiento (Schumann, 2002). El efecto de reducción de pH de la lactulosa es conocido por disminuir las bacterias productoras de amoníaco y reducir así el nivel de amoníaco en sangre, siendo una forma efectiva de tratamiento de la encefalopatía hepática, trastornos psiquiátricos y neurológicos por neurotoxina en el cerebro. La lactulosa está clasificada como un medicamento en los Estados Unidos, la UE y Japón, y se obtiene a través de la reacción de isomerización de lactosa, es decir, la reagrupación del residuo de glucosa a la molécula de fructosa (Hwan Seo *et al.*, 2015). Esta reacción puede facilitarse mediante dos enfoques diferentes, ya sea química o enzimáticamente. La producción industrial de lactulosa se lleva a cabo exclusivamente por el método químico llamado Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein, por el cual la mitad de glucosa se isomeriza a fructosa catalizada por grupos hidroxilo en un medio alcalino, y es afectada por el pH, presión y temperatura. Hwan Seo *et al.* (2015) trabajó con una solución con 40 g/L de lactosa, adicionando 0,53% de Na_2CO_3 como catalizador y sometido a una temperatura de calentamiento de 90 °C por 20,41 min obteniendo un rendimiento de 29,6% de lactulosa.

Los galacto-oligosacáridos (GOS) son oligosacáridos formados por la unión de un número variable de moléculas de galactosa a una molécula de glucosa terminal, unidas por enlaces β -(1-3) y β -(1-6) siendo predominante el enlace β -(1-4). Estos son sintetizados a partir de la transgalactosilación (β -galactosidasa) utilizando la lactosa como sustrato. Los GOS son carbohidratos no digeribles, siendo clasificados como ingredientes prebióticos de alto valor añadido (Calvacante & Pastore, 2015). Bohorguez (2016) trabajó en la síntesis de GOS utilizando la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada por tres métodos diferentes (adsorción, enlace covalente al quitosano y la agregación de enlaces cruzados) las cuales fueron comparadas en términos del rendimiento del preparado inmovilizado, características enzimáticas, estabilidad y eficiencia en la síntesis de oligosacáridos a partir del 20% de lactosa utilizada. La inmovilización con quitosano dio el rendimiento máximo en la síntesis de oligosacáridos (17,3% del total de azúcar) en comparación con la enzima libre (10%) en 2 h a 40 °C. Huerta *et al.* (2011) en su estudio sobre la síntesis por lotes de GOS utilizando un preparado enzimático de β -galactosidasa de *A. oryzae* obtuvieron un porcentaje máximo de GOS de 25,11%, con un rendimiento de 0,54 g GOS/g lactosa, una conversión del 46,37% y una productividad volumétrica y específica de 4,53 g GOS/min L y 9,9 g GOS/min g enzima, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por Yang & Bednarcik (2001) que utilizando el mismo preparado enzimático inmovilizado en tela de algodón encontró que la β -galactosidasa de *A. oryzae* fue capaz de producir trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos y hexasacáridos.

1.2. PROCESO DE FILTRACIÓN DEL SUERO DE QUESERÍA PARA LA OBTENCIÓN DE SUSTRATO PROTEINIZADO

El potencial de conversión de subproductos alimenticios a bioetanol se ha estudiado a lo largo de los años. La producción de etanol a partir de subproductos alimenticios se podría realizar en 3 pasos: (1) preparación de la materia prima o medio de fermentación que incluye la hidrólisis que convierte la materia prima en glucosa; (2) fermentaciones para convertir la glucosa en etanol y dióxido de carbono; y (3) separación y purificación de etanol por destilación, procesos que se irán describiendo a lo largo de esta introducción.

En concreto el proceso de elaboración de un medio de fermentación (sustrato) para la obtención biotecnológica de los sueros de quesería incluye procesos de separación por

ultrafiltración de las proteínas de suero (retenido), de la lactosa y sales minerales (permeado desproteinizado). La lactosa presente en el permeado desproteinizado puede ser hidrolizada con la enzima β -galactosidasa con la finalidad de producir glucosa-galactosa, y posteriormente el permeado hidrolizado es concentrado en evaporador discontinuo con la finalidad de extraer el agua por evaporación y concentrar el medio de fermentación a valores deseados de sólidos totales y azúcares reductores, para proceder después a su utilización como sustrato de fermentación.

La filtración utilizando membranas es un proceso físico en el cual, mediante la aplicación de una presión se produce la separación de un producto determinado en sus componentes, obteniéndose dos partes: el permeado que contiene los constituyentes que pueden pasar a través de la membrana y el concentrado, que contiene aquellos otros que son retenidos (Cuartas, 2005). En la Figura 4 se esquematiza el funcionamiento general de un proceso de separación por membranas, así como cada una de las corrientes que genera (permeado y concentrado).

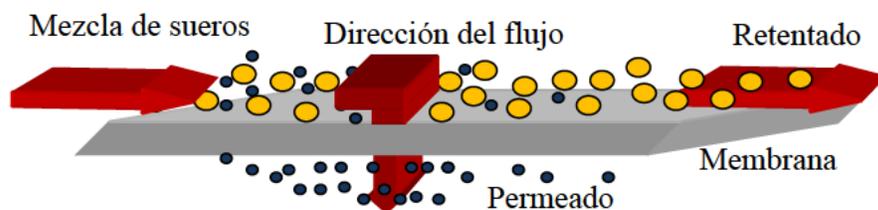
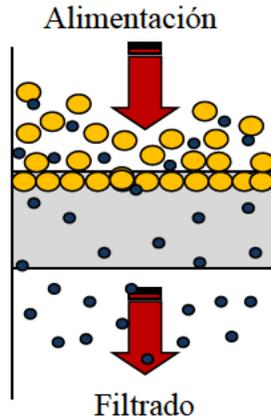


Figura 4. Principio básico de operación de una membrana.

Los procesos de filtración convencional, tipo filtros de carbón activo, arena y antracita, etc. operan bajo el principio de la filtración estática. Se caracterizan por que la fuerza impulsora es la gravedad y la presión solo se aplica para acelerar el proceso, siendo la dirección del flujo perpendicular al medio filtrante, mientras que los procesos de membranas lo hacen con la filtración dinámica. La presión es la fuerza impulsora de este proceso de separación y para evitar la colmatación de las membranas, el flujo debe ser tangencial a la superficie de las mismas, tal como se muestra en la Figura 5.

a. Filtración perpendicular



b. Filtración tangencial

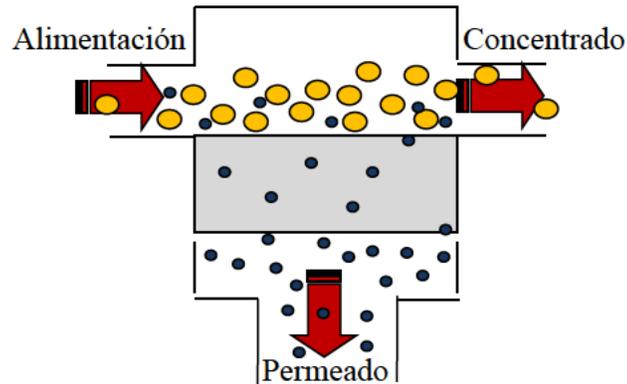


Figura 5. Filtración convencional o perpendicular (a) y tangencial (b).

Fuente: Saavedra & Romero (1999).

Los procesos de filtración tangencial se clasifican de manera general de acuerdo al tamaño de poro y a la presión utilizada como fuerza impulsora en: (1) Microfiltración (MF), proceso que utiliza membranas que poseen un tamaño de poro mayor de 50 nm, siendo las presiones de operación inferiores a los 0,2 MPa. La MF es usada principalmente para separar partículas y bacterias; (2) Ultrafiltración (UF), proceso que utiliza membranas que poseen un tamaño de poro entre 50 y 2 nm. El intervalo de presiones de operación se sitúa entre 0,1 y 1 MPa. La UF es utilizada para separar contaminantes microbiológicos, coloides (proteínas) y en general moléculas de gran tamaño; (3) Nanofiltración (NF) proceso que utiliza membranas con un tamaño de poro menor de 2 nm. El intervalo de presiones de operación se sitúa entre 0,8 y 2,8 MPa. La NF permite separar los azúcares de otras moléculas orgánicas, así como sales minerales multivalentes de moléculas orgánicas, y sales multivalentes de las monovalentes, debido a los efectos de exclusión iónica y estérica, y es habitualmente usada para concentrar y desmineralizar parcialmente el suero lácteo (Cuartas, 2005). Cada día la NF está siendo ampliamente utilizada en la industria láctea para la concentración y desmineralización de sueros dulces y ácidos. Las principales ventajas de las membranas de NF en aplicaciones lácteas son generalmente que exhiben una alta permeabilidad por iones monovalentes (entre 40 a 90%), y una baja permeabilidad por iones multivalentes (entre 5 a 20%) y compuestos orgánicos (proteínas, lactosa y urea) (Jonggeon *et al.*, 2000); (4) Ósmosis inversa (OR), proceso de membrana que posee el nivel

más fino de la filtración, pues no tiene poros. Actúa como una barrera selectiva a todos los iones disueltos y moléculas orgánicas con un peso molecular superiores a 100 Da. En cambio, las moléculas de agua pasan libremente a través de la membrana y puede ser usada para concentrar el suero o la leche desnatada, el intervalo de presiones de operación se sitúa entre 2,5 y 3,5 MPa.

En los procesos descritos la presión va aumentando progresivamente desde la MF hasta la OR. Con el uso de estas tecnologías la separación de los componentes se lleva a cabo sin cambio de fase, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista económico, pues el consumo energético no es elevado. El mecanismo de separación depende de alguna propiedad específica de los componentes que serán separados selectivamente por la membrana. Básicamente existen tres mecanismos: (1) separación debida a grandes diferencias de tamaño (mecanismo de cribado), que puede ser clasificados como operaciones de membrana en MF, UF y en parte NF; (2) separación basada en las diferencias de solubilidad y difusividad de los materiales de las membranas (mecanismo de disolución/difusión). En este mecanismo se ubican los procesos de OR y NF; (3) separación basada en las diferencias de carga de las especies (efecto Donnan), característico de membranas de NF.

1.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA LACTOSA

La hidrólisis enzimática es el primer paso en la mayoría de los bioprocesos para la valorización de los subproductos alimenticios. El proceso de hidrólisis produce azúcares, que incluyen glucosa, fructosa, xilosa, ribosa y galactosa a partir de los diferentes subproductos utilizados y el rendimiento de los azúcares depende principalmente de la naturaleza y composición de los propios subproductos (Halimatun *et al.*, 2015).

La productividad y la concentración de etanol pueden variar con respecto a la concentración de azúcares en el medio de fermentación. Sin embargo, la selección de la enzima ideal con respecto a la composición del subproducto puede mejorar el proceso de hidrólisis. Teniendo en cuenta los tipos de subproductos alimenticios utilizados en la obtención de etanol, se han utilizado diferentes enzimas, incluidas amilasas, proteasas,

celulasas, lipasas y pectinasas, en la preparación y obtención de azúcares fermentables (Kiran *et al.*, 2014).

La β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) es una enzima conocida por catalizar la hidrólisis de galactósidos como la lactosa a monosacáridos (rompe el enlace β -1,4-glicosídico y libera glucosa y galactosa), está presente en una gran variedad de organismos incluyendo plantas, animales y microorganismos (Juca & Perez, 2010). Las empresas lácteas y farmacéuticas la utilizan en la hidrólisis de lactosa presente en la leche y la obtención de productos como leches deslactosadas, fórmulas infantiles, fórmulas nutricionales para adultos, productos orientados a personas que son intolerantes a la lactosa por no producir la enzima en cantidad suficiente (Avalos, 2003; Rajoka *et al.*, 2003). Otras aplicaciones están relacionadas con la hidrólisis de la lactosa durante la fabricación de helados, suero de leche, dulce de leche, leche condensada evaporada y azucarada con la finalidad de evitar la cristalización durante la vida útil (Juca & Perez, 2010). La β -galactosidasa puede ser obtenida a partir de diferentes microorganismos como *Escherichia coli*, que aunque sea una especie bastante estudiada, no se utiliza en el procesamiento de alimentos debido a su alto costo y a la posibilidad de provocar problemas de toxicidad cuando se usan extractos crudos de coliformes. Las obtenidas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces sp.*, (*lactis o fragilis*) son consideradas fuentes seguras de utilización en alimentos (Harju *et al.*, 2012). Existen otros microorganismos de donde se obtiene β -galactosidasa como *Bacillus stearothermophilus*, *Pyrococcus woesei*, *Thermus sp.*, entre otros y son relativamente estables a temperaturas de 35 a 80 °C (Cárdenas, 2012). La actividad y estabilidad térmica de esta enzima está influenciada por factores medio ambientales (temperatura, pH, medio donde reacciona) los cuales pueden afectar la estructura tridimensional específica o conformación espacial de la proteína (Henley & Sadana, 1984; Volkin & Klibanov, 1989). Uno de los factores más estudiados que afectan la actividad y estabilidad de la β -galactosidasa son los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+ y K^+ . El ion Ca^{2+} inhibe la actividad de la enzima, mientras que el ion Mg^{2+} incrementa su actividad. El ion de Na^+ puede entrar en la estructura de la proteína, induciendo cambios conformacionales en la enzima, los cuales son capaces de desactivarla (Garman *et al.*, 1996). Contrariamente la presencia de iones NH_4^+ y K^+ , los cuales tienen un radio similar, estimulan la actividad enzimática. La influencia de estos iones puede estar relacionada a

que aportan resistencia a la inactivación térmica de la proteína por reducción de la flexibilidad de cadena principal de polipéptidos.

A nivel comercial existen varias marcas que distribuyen preparaciones enzimáticas de la enzima β -galactosidasa, cuyas características varían de acuerdo con el microorganismo utilizado para obtener la enzima. Generalmente las preparaciones comerciales de lactasas de origen fúngico, especialmente *A. niger* y *A. oryzae*, son de gran importancia, cuando las condiciones de operación están en un rango de pH ácido (2,5-4,5 a 35 °C), siendo apropiadas para la hidrólisis del suero ácido. Las β -galactosidasas provenientes de levaduras como *K. fragilis* con un pH óptimo de 6,50-7,0 a 40 °C, *K. lactis* con un pH óptimo entre 6,6-6,8 a 35 °C y *K. marxianus*, tienen un pH óptimo concentrado en la región neutra, son bien aceptadas para la hidrólisis de la lactosa de la leche y del suero dulce. Entre tanto, estas últimas son fuertemente inhibidas por alta concentración de calcio en la leche y pequeñas concentraciones de sodio. Son también inhibidas por la presencia de galactosa y glucosa (Gamarra-Ballena & Woolcott-Hurtado, 2000). Presentan temperatura óptima de actividad entre 30 y 40 °C, lo que representa una desventaja, pues facilita la contaminación microbiana, siendo aconsejable, un periodo corto de hidrólisis, de 2 a 3 h (Mahoney, 1997; Cardenas, 2012).

1.4. LAS LEVADURAS

Las levaduras son microorganismos unicelulares con un tamaño de 5 a 10 μm y un pequeño diametro de alrededor de 5 μm , que se reproducen asexualmente por gemación de excrecencias en determinadas partes de la célula madre. La célula madre pasa un núcleo con el material genético, mitocondrias propias y plasma celular a la excrecencia, la cual se estrangula y se separa cuando éste es lo suficientemente grande (Walker & Stewart, 2016).

Las levaduras requieren una actividad de agua mínima de 0,88 y producen fermentaciones alcohólicas bajo condiciones anaeróbicas, donde la glucosa en el interior de la célula es fermentada (ecuación de Gay-Lussac, Ecuación 1), obteniéndose un rendimiento en peso iguales entre dióxido de carbono y etanol, además de energía.



En las siguientes secciones se abordará los factores que afectan el desarrollo y poder fermentativo de las levaduras y las especies más comúnmente utilizadas en la producción de etanol.

1.4.1 Influencia del entorno

Las condiciones del entorno están directamente relacionadas con el incremento de las levaduras en el medio de fermentación que se utiliza para procesos de desarrollo celular (producción de masa celular) o fermentación para la producción de etanol. A continuación, se detallan los principales factores a tener en consideración.

1.4.1.1 Carbohidratos y otras necesidades nutricionales

La sacarosa del jugo de caña de azúcar, la glucosa obtenida de la hidrólisis del maíz y como segunda generación los sustratos obtenidos de biomásas lignocelulósicas corresponden a los principales medios de fermentación utilizados en la actualidad para la producción de etanol a nivel mundial, por ser económicamente rentables, siendo los permeados de suero de quesería otra fuente de sustrato interesante para las levaduras como fuentes de carbono, proteínas y minerales para el crecimiento y producción de etanol (Guimarães *et al.*, 2010). La Tabla 4 muestra diferentes sustratos de desechos alimentarios utilizables en la producción de etanol, y los parámetros óptimos requeridos para la producción máxima de etanol (Saeed *et al.*, 2018).

Estos medios de fermentación reúnen ciertos requerimientos nutricionales para las levaduras y los mismos aportan los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir las necesidades energéticas de las levaduras. La fuente de carbono corresponde a los compuestos mayoritarios de la célula y de ellas, los glúcidos son los más frecuentemente utilizados como monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa, etc), disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa), y trisacáridos (maltotriosa, rafinosa) (Drapcho *et al.*, 2008; Sanchez & Cardona, 2008). Generalmente en procesos de fermentación económicamente rentables las concentraciones de carbohidratos oscilan entre 20 y 30%. Las levaduras durante la fermentación tienen que sobrevivir a medios con altos contenidos de azúcar (hasta un 30%), por lo cual, están sometidas a estrés hiperosmótico al inicio y al final de la fermentación con valores de hasta 10% de etanol (Hohmann & Mager, 1997).

Tabla 4. Parámetros óptimos requeridos para maximizar la producción de etanol utilizando diferentes tipos de desechos alimentarios.

Desecho	Condición	Microorganismo	Parámetros óptimos				G.C g/L	C.E g/L	R.E (%)	Referencias
			pH	T.S (°C)	T.F (°C)	t.F (h)				
Residuo de alimentos	NR	<i>S. cerevisiae</i>	4,5	60	30	48	NR	32,2	NR	Uncu & Cekmecelioglu (2011)
Residuos alimenticios de cocina	Esterilizada	<i>Z. mobilis</i> 10225	5,0	60	35	40	NR	53,4	NR	Ma <i>et al.</i> (2008)
Residuos alimenticios de cocina	Bacterias ácido lácticas	<i>S. cerevisiae</i> KF-7	4,0	60	30	42	74	29,9	NR	Tang <i>et al.</i> (2008)
Residuos alimenticios	No esterilizada	<i>Z. mobilis</i> A7-2	4,0	50	30	44	NR	NR	9,3	Wang <i>et al.</i> (2011)
Lixiviado de residuos de comida coreana	NR	<i>S. cerevisiae</i>	5,0	45	NR	38	NR	24,17	NR	Man <i>et al.</i> (2010)
Jugo dulce de sorgo	NR	<i>S. cerevisiae</i> NRRLY-2034	5,4	NR	30	NR	NR	NR	8,83	Phutela & Kaur (2014)
Residuos de pulpa de café	Esterilizada	<i>Pichia</i> M4	4,5	NR	30	NR	NR	NR	4,07	Hamadi <i>et al.</i> (2014)
<i>Ziziphus mauritiana</i>	NR	<i>S. cerevisiae</i> NA33	6,0	NR	30	NR	NR	63	NR	Togarepi (2012)
Maíz	NR	<i>S. cerevisiae</i> MTCC4043	5,8	NR	31	NR	NR	74,6	NR	Walia <i>et al.</i> (2014)
Almidón de sagú	NR	<i>Z. mobilis</i> ZM4	5,0	NR	36,74	17	NR	70,68	97,08	Bvv <i>et al.</i> (2003)
Patatas dulces	NR	<i>S. cerevisiae</i> y <i>Pichia sp.</i>	5,0	NR	30	72	NR	127	NR	Dash <i>et al.</i> (2017)
Melaza de caña de azúcar	NR	<i>S. cerevisiae</i> BIO-07	4,5	NR	30	NR	NR	76,8	NR	Tahir <i>et al.</i> (2010)
Semillas frescas de yaca	NR	Loog-pang Kao Mhark	5,2	NR	32,2	124,5	NR	NR	11,5	Chongkhong <i>et al.</i> (2012)

T.S: Temperatura de sacarificación, T.F: Temperatura de fermentación, t.F: Tiempo de fermentación, G.C: Glucosa, C.E: Concentración de etanol, R.E: Rendimiento de etanol, NR: Sin registro, Loog-pang Kao Mhark: Cultivo iniciador de levaduras elaborado de torta de arroz.

La levadura *S. cerevisiae* requiere una alta actividad a_w de alrededor de 0,65. El agua es absolutamente esencial para la fermentación, y los medios con alto contenido de azúcar pueden imponer estrés osmótico (disponibilidad reducida de agua) en las células para afectar adversamente la fisiología celular (Walker & Stewart, 2016).

Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento de agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular; una vez que el organismo se adapta, se retoma el crecimiento (Folch-Mallol *et al.*, 2004). La producción de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa es un mecanismo celular contra el estrés osmótico en un medio de fermentación con concentraciones entre 2 a 20% de glucosa al que se enfrentan las levaduras al inicio de la fermentación (Jiménez Martí *et al.*, 2011).

Si bien los carbohidratos son el componente principal de los medios de fermentación, estos aportan otros componentes que son importantes para el desarrollo y actividad fermentativa de las levaduras. Así, el nitrógeno interviene en la producción de aminoácidos, nucleótidos y algunas vitaminas.

El azufre forma parte del 60% de las proteínas e interviene en la producción de aminoácidos sulfurados libres, así como también está presente en algunas vitaminas. El potasio es un elemento mineral cualitativamente más importante en las levaduras, ya que a pH ácido el potasio estimula la fermentación y la respiración, además actúa como cofactor de numerosas enzimas. El magnesio es necesario para el buen funcionamiento de muchas enzimas del metabolismo, y está implicado en las estructuras de los ribosomas, de las membranas nucleares y ácidos nucleicos. Una carencia de magnesio en la fermentación alcohólica conlleva a la producción de ácido acético. Otros iones que juegan papel importante son calcio, fósforo, manganeso, zinc, hierro, bario, cloruro, y sodio (Leveau & Bouix, 2000).

En el caso concreto de los sueros de quesería se han descrito ciertas limitaciones nutricionales sobre todo cuando se utilizan sueros o permeados concentrados con

concentraciones elevadas de lactosa. Así, Janssens *et al.* (1983) observaron limitaciones en la fermentación de altas concentraciones de lactosa y mostraron mejoras en la habilidad fermentadora de la levadura *K. fragilis* utilizando sueros concentrados (200 g/L de lactosa) suplementados de lípidos como ergosterol y ácido linoleico, obteniendo una reducción de los tiempos de fermentación de 90 a 60 h. Los beneficios de esta suplementación lipídica parecen estar relacionados con su incorporación a nivel de la membrana celular mejorando la actividad fermentativa de la levadura y su tolerancia al etanol. Otras suplementaciones que han sido descritas incluyen el uso de amonio sulfato, urea o peptona (Mahmoud & Kosikowski, 1982), extractos de levadura, vitaminas y minerales (Vienne & Von Stockar, 1985) y sales de NH_4Cl y KH_2PO_4 (Kargi & Ozmihci, 2006).

1.4.1.2 Temperatura y pH

La tasa de crecimiento de los microorganismos se ve directamente afectada por la temperatura. La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras es 30 °C con un intervalo de 25-45 °C (Guimarães *et al.*, 2010; Vincenzi *et al.*, 2014). Las células libres de *S. cerevisiae* tienen una temperatura óptima cercana a los 30°C, mientras que las células inmovilizadas presentan una temperatura óptima ligeramente más alta debido a su capacidad para transferir calor desde la superficie de las partículas al interior de las células (Liu & Shen, 2008).

La alta temperatura, que es desfavorable para el crecimiento celular, se convierte en un factor de estrés para los microorganismos (MarelneCot *et al.*, 2007). Las enzimas que regulan la actividad microbiana y el proceso de fermentación son sensibles a altas temperaturas que pueden desnaturalizar su estructura terciaria e inactivar las enzimas (Phisalaphong *et al.*, 2006). Un incremento de 10 a 15 °C por encima de la temperatura óptima de crecimiento de 30 °C induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (por sus siglas en inglés *Heat Shock Proteins*). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, la degradación de las proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Si un organismo se expone de manera abrupta a un choque térmico de 20 a 25 °C por encima de su temperatura óptima de crecimiento, este morirá. Sin embargo, si antes de exponerlo a una temperatura

letal se le induce primero por un periodo breve a una temperatura supraóptima no letal (de 10 a 15 °C por arriba de la óptima de crecimiento), este adquiere la capacidad de sobrevivir a la temperatura letal. Este fenómeno se conoce como inducción de la tolerancia (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Así, la temperatura se debe regular cuidadosamente durante todo el proceso de fermentación.

La producción de etanol está influenciada también por el pH del medio de fermentación, ya que por una parte el pH afecta a la configuración de las proteínas, y en el caso de la fermentación alcohólica toda una serie de enzimas son las responsables de los procesos metabólicos que ocurren (Figura 3), y por otra la permeabilidad de algunos nutrientes esenciales en las células está influenciada por la concentración de H⁺ en el medio de fermentación (Zabed *et al.*, 2014). Además, la supervivencia y el crecimiento de las levaduras está influenciado por el pH en el intervalo de 2,75-4,25 (Fleet & Heard, 1993). En la fermentación para la producción de etanol, el intervalo óptimo de pH de *S. cerevisiae* es de 4,0 a 5,0 (Lin *et al.*, 2012). Según Staniszewski *et al.* (2007) cuando el pH del medio de fermentación está por debajo de 4,0 se requiere un periodo de incubación más largo pero la concentración de etanol no se reduce significativamente. Sin embargo, cuando el pH se sitúa por encima de 5,0 la concentración se reduce sustancialmente.

Ma *et al.* (2016b) estudiaron el efecto de diferentes pH (intervalo 3,5 a 6) en la cinética del proceso de fermentación de etanol observando que la eficiencia de la fermentación, la densidad celular (OD₆₀₀) y la concentración de etanol aumentaron cuando el pH se situó en 3,5-4 (97,16%; 3,9 y 99,6 g/L, respectivamente), y disminuyó gradualmente con un aumento del pH de 5-6 para alcanzar valores de 74,6%; 3,52 y 76,5 g/L, respectivamente. Otro estudio mostró el efecto del pH en la fermentación con etanol utilizando medios sacarificados con un pH de 3,5; 4 y 4,5 obteniendo una concentración máxima de etanol de aproximadamente 30 g/L a pH 4-4,5 (Tang *et al.*, 2008).

1.4.1.3 Oxígeno

El oxígeno interviene en el metabolismo celular de las levaduras. En medios de fermentación en presencia de oxígeno, las levaduras tienden a respirar consumiendo glucosa y O₂, y produciendo CO₂ y H₂O, con una producción nula o mínima de etanol durante la respiración celular, afectando negativamente los rendimientos de etanol. En

medios de fermentación en ausencia de oxígeno, las levaduras realizan el proceso de fermentación, donde consumen glucosa y O_2 produciendo etanol y CO_2 (Quiros *et al.*, 2014).

El suministro de oxígeno debe ser suficiente para cumplir con el requisito de la biosíntesis de los lípidos de membrana (esteroles y ácidos grasos insaturados), sin causar un crecimiento excesivo de levadura que pueda reducir el rendimiento de etanol. Silveira *et al.* (2005) investigaron el efecto del nivel de oxígeno en la fermentación de un permeado de suero con concentraciones de lactosa que oscilaron entre 1 y 240 g/L por *K. marxianus*, donde los niveles bajos de oxígeno favorecieron el metabolismo fermentativo, lo que llevó a mayores productividades volumétricas de etanol en condiciones hipóxicas, seguidas de condiciones anóxicas y luego aeróbicas. Otros estudios previos también han abordado la influencia del oxígeno en los patrones del metabolismo energético de *K. marxianus* cultivado en soluciones de lactosa (Castrillo & Ugalde, 1993; Castrillo *et al.*, 1996). Del mismo modo, la distribución entre el metabolismo respiratorio y fermentativo en *K. lactis* también ha sido intensamente estudiado, particularmente con respecto al efecto de la disponibilidad de oxígeno (Breuning *et al.*, 2000; Goffrini *et al.*, 2002; Snoek & Steensma, 2006).

El oxígeno también afecta la actividad fermentativa de la levadura *S. cerevisiae* debido a que la fermentación suministra poca energía, y su crecimiento es lento. A medida que la concentración de oxígeno incrementa, la producción de ácido acético también incrementa, mientras que la de etanol disminuye (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003). Esta levadura es fuertemente acidogénica, y ha sido reportado que produce altas concentraciones de ácido acético (por lo menos 5 g/L) en condiciones aerobias (Ciani & Ferraro, 1997).

Quiros *et al.* (2014) indicaron que las levaduras *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *Kluyveromyces* sp son *Crabtree* positivas, es decir levaduras que en un medio de fermentación con altas concentraciones de azúcares y en presencia de oxígeno (aeróbico) seleccionan como ruta metabólica activa la fermentativa, produciendo etanol y CO_2 , en lugar de producir biomasa, CO_2 y H_2O por respiración.

1.4.1.4 Concentración de cloruro de sodio

Cuando un organismo se enfrenta a una condición de estrés salino se generan, simultáneamente, dos tipos de estrés; por un lado, hay una condición de estrés osmótico que depende de la concentración de sal usada y, por otro lado, hay una toxicidad provocada por los diferentes iones (Folch-Mallol *et al.*, 2004; Logothetis *et al.*, 2007). Se ha calculado que una concentración de sal de 50-150 mM corresponde a la fuerza iónica que se encuentra dentro del citoplasma de muchos organismos y, existe evidencia que demuestra que estas concentraciones tienen efectos positivos en la estructura de las proteínas debido a las fuerzas electrostáticas que se generan. Por otro lado, se ha mostrado que altas concentraciones salinas (más de 300-500 mM) inhiben las reacciones metabólicas ya que perturban el balance hidrofóbico-electrostático afectando así el funcionamiento proteínico (Folch-Mallol *et al.*, 2004). No todos los iones afectan con la misma magnitud el funcionamiento proteínico y, se ha propuesto un orden tanto para aniones como para cationes en función del grado de perturbación que pueden causar a las diferentes proteínas. Para los aniones el orden decreciente en cuanto a daño es $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ y, para los cationes $\text{Ca}_2^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$.

Adicionalmente a estos efectos salinos no específicos que ocurren a altas concentraciones, algunas enzimas son especialmente sensibles a la inhibición de su actividad causada por los iones Na^+ o Cl^- , aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, probablemente debido a la interacción específica de los iones con sitios importantes de la proteína. Además, todos los organismos difieren en cuanto a su sensibilidad a los diferentes iones; por ejemplo, en la levadura *S. cerevisiae*, el ión Na^+ resulta más tóxico que el K^+ o el Cl^- cuando el cultivo crece en glucosa como fuente de carbono. Cuando este organismo se enfrenta a una situación de estrés por NaCl, la respuesta se centra en mantener una homeostasis adecuada del ion Na^+ al regular no sólo su concentración interna sino al mantener una relación alta K^+/Na^+ (Blomberg & Adler, 1989; Hocking, 1993). Esto último es muy importante, ya que la toxicidad por Na^+ (en un cierto nivel) se puede revertir añadiendo K^+ . Esto se puede explicar porque el Na^+ puede entrar a las células de levadura a través de los canales de K^+ (Wadskog & Adler, 2003) y, parte de su toxicidad se debe a que interfiere con los procesos celulares que requieren del K^+ . Para prevenir una toma excesiva de Na^+ , los canales de K^+ cambian de un estado de baja afinidad a otro de alta afinidad lo cual les permite discriminar

entre los dos iones e incorporar, preferencialmente, K^+ . En concentraciones de NaCl de 0,61 a 0,91 mol/kg y con actividad de agua (a_w) de 0,97 a 0,98 la respuesta metabólica de la célula es la acumulación de trehalosa para proteger la membrana celular de la levadura (Hounsa, 1998; Vital & Larralde, 2016). Tekolo (2010) trabajó con soluciones preparadas a partir de NaCl y sorbitol con a_w de 0,975; 0,95; 0,925; 0,90 y 0,875, indicando que se produce activación del transporte de membrana y acumulación de polioles como el glicerol, como respuesta metabólica para proteger la membrana celular. Modig *et al.* (2007) estudiaron el estrés hiperosmótico de cepas de *S. cerevisiae* relacionado con la presencia de sales presentes en el medio de fermentación, y observaron una disminución de la conversión de glucosa a etanol entre 80 a 90% en medios de fermentación que contenían 40 g de NaCl por litro, un aumento en el rendimiento de glicerol (de 0,072 a 0,148 g/g glucosa) y una menor productividad de biomasa en todas las cepas utilizadas.

1.4.1.5 Etanol y otros coproductos

El etanol es el principal producto obtenido durante la fermentación alcohólica (0,538 g de etanol por gramo de azúcar reductor consumido), el cual al incrementar su concentración tiende a afectar los procesos metabólicos por estrés osmótico de la célula de levadura. *Saccharomyces cerevisiae* es la más usada en procesos industriales de fermentación por su capacidad de tolerar hasta concentraciones de 20% (v/v) de etanol sin sufrir inhibición (Antoni *et al.*, 2007; Cot *et al.*, 2007), en el caso de la *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity también puede tolerar hasta concentraciones de 17% (v/v) de etanol sin sufrir inhibición (Dolmar, 2018) y en el caso de *Kluyveromyces marxianus* las concentraciones más altas de etanol producidas son de 80 g/L en soluciones concentradas de sueros en polvo con 15% de lactosa (Kargi & Ozhmici, 2006). Durante la fermentación alcohólica de los sueros de quesería, los azúcares reductores se convierten en dióxido de carbono y etanol en una proporción similar (peso/peso) (Lewis & Young, 2002; Risner *et al.*, 2018), siendo el anhídrido carbónico el principal coproducto obtenido durante la fermentación en una proporción de 0,462 g de CO_2 por gramo de azúcar reductor consumido (Koushki *et al.*, 2012; Risner *et al.*, 2018). Es importante recordar que la principal función de la fermentación es la producción de energía (ATP) para los procesos metabólicos y división celular con la finalidad de obtener una nueva célula a partir de la célula madre. Las levaduras utilizan la mayor parte del contenido de nutrientes disponibles

del suero durante la fermentación, sin embargo la demanda biológica y química de oxígeno que no se ha reducido del subproducto, se encuentra en gran parte como biomasa en forma de levadura (Devesa-Rey *et al.*, 2011; Risner *et al.*, 2018). Esta cantidad de biomasa de levadura producida durante la fermentación, reduce los rendimientos de etanol al utilizar parte de los azúcares reductores y nutrientes en la producción de biomasa celular, siendo el segundo coproducto que se produce en mayor proporción después del dióxido de carbono. Existen otros coproductos que se generan durante la fermentación secundaria de las levaduras en cantidades muy bajas en comparación al dióxido de carbono y biomasa celular, los cuales son muy importantes en el desarrollo de sabores específicos en las bebidas alcohólicas, entre ellos el glicerol (poliol), que corresponde al tercer metabolito que se produce en mayor cantidad después del etanol y dióxido de carbono durante la fermentación, el cual aporta viscosidad (sensación en la boca) como atributo deseado en vinos (Walker, 2014). Los alcoholes superiores como el alcohol isoamílico, el isopropanol y el feniletanol imparten sabores y aromas muy deseables a las bebidas fermentadas, especialmente en licores destilados. Los ésteres representan un grupo muy importante de compuestos de sabor activo que generalmente resultan en aromas y sabores florales aromáticos deseables en bebidas fermentadas, principalmente cerveza y vinos. La concentración de ésteres producidos durante la fermentación depende de la abundancia relativa de los alcoholes correspondientes y los acil CoAs, pero como el acetyl CoA y el etanol son los más abundantes, el acetato de etilo es el éster predominante producido. También, durante la fermentación se producen ácidos orgánicos como succínico, cítrico y acético que contribuyen de manera beneficiosa a la astringencia o "agudeza" de las bebidas fermentadas. Con respecto a los compuestos fenólicos el 4-vinilguiacol aporta un sabor similar al clavo (*Syzygium aromaticum*) que es deseable en ciertos estilos de cerveza y puede ser producido por cepas de levadura *S. cerevisiae*. En el caso de los compuestos sulfurados, el sulfuro de hidrógeno, el dimetil sulfuro y el dióxido de sulfuro son compuestos importantes que aportan sabor y aroma a las bebidas. Por ejemplo, en la cerveza, el dimetil sulfuro si está presente en bajas concentraciones, es un atributo deseable, pero concentraciones más altas imparten sabores desagradables (Walker & Stewart, 2016). El acetaldehído es un coproducto de la fermentación 20 veces más tóxico que el etanol y posible carcinógeno, por lo cual debe asegurarse que las levaduras a seleccionar en las

fermentaciones alcohólicas, no produzcan este tipo de compuestos intermedios como producto final (compuestos de carbono) que afectan gravemente la salud pública (National Institute Cancer, 2018). En ninguno de los trabajos revisados sobre producción de etanol a partir de suero de quesería se ha reportado presencia de acetaldehído (Dragone *et al.*, 2011; Ariyanti & Hadiyanto, 2013; Araujo *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016).

El metanol es el coproducto de mayor interés obtenido durante la fermentación alcohólica por sus efectos nocivos para la salud humana, el cual al ser consumido en altas concentraciones puede provocar desde ceguera hasta la muerte (Blanco *et al.*, 2006). La concentración de metanol al final de la fermentación alcohólica va a depender de la cantidad de pectina proveniente de la fruta o tejido vegetal de donde se extrajo el jugo a fermentar. El metanol no es un producto de la fermentación alcohólica, ya que su presencia en este tipo de bebidas se debe a la desesterificación de las pectinas por las pectinestearasas presentes en las frutas. El contenido promedio de metanol en vino tinto es de 2,122 mg /L, en vino blanco 1,118 mg/L, en brandy 1,500 mg/L, en whisky 1,000 mg/L y en ron 0,800 mg/L, aún cuando algunas bebidas alcohólicas son destiladas para aumentar el contenido de alcohol etílico y disminuir el de otros alcoholes contaminantes (Klaassen *et al.*, 2013). Guzman *et al.* (2009) determinaron compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de la mezcla de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*, obteniendo como resultado que la concentración de metanol fue mayor en *A. angustifolia* que en *A. potatorum*, diferencia que se atribuyó a la especie de agave; según los autores es probable que ello se deba a la desmetilación de pectinas de los agaves por efecto de las temperaturas altas y del pH ácido. Rodríguez *et al.* (2011) trabajaron en la producción de alcohol a partir del mucílago de café, cuyo contenido de pectina en base seca está alrededor del 10%, por lo que se favorece la producción de metanol por desmetilación enzimática de las pectinas, obteniendo 32,73 mg de metanol por cada de litro de alcohol anhidro en fermentación natural utilizando la levadura *S. cerevisiae*. Estos valores se encuentran dentro de las cantidades máximas permitidas de metanol en una bebida alcohólica que es de 25 mg/100 mL de alcohol anhidro (COVENIN 3340:1997).

Diferentes autores que han trabajado en la producción de etanol a partir de suero de quesería no han reportado presencia de metanol en sus fermentaciones (Dragone *et al.*, 2011; Ariyanti & Hadiyanto, 2013; Araujo *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016). En el etanol de

suero no se ha conseguido reportes que indiquen presencia en concentraciones altas de metanol que puedan afectar la salud, lo cual está relacionado con la ausencia de pectinas en la composición de los permeados de suero. Chimbo (2015) trabajó en la producción de etanol a partir de suero de leche hidrolizado utilizando la levadura *S. cerevisiae*, obteniéndose resultados entre 0,014 y 0,019 % (v/v) de metanol, valores que se encuentran por debajo del mínimo de 0,1 % (v/v) de metanol establecido por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1837:2011 de bebidas alcohólicas. Licores. Requisitos, y por la norma COVENIN 3340:1997. Puente (2018) elaboró de una bebida alcohólica a partir de suero dulce de leche provenientes de queso fresco y mora (*Rubus glaucus Benth*) utilizando la levadura *S. cerevisiae* y diferentes mezclas entre suero de quesería (55, 60 y 65%) y mora (15, 20 y 25%), obteniendo para un total de 9 tratamientos, resultados de metanol que oscilaron entre 0,28 a 0,45 mg/L, valores que se encuentran muy por debajo de los límites máximos permitidos para bebidas alcohólicas.

1.4.1.6 Otros factores

El tiempo de fermentación afecta el crecimiento de las levaduras. Un tiempo de fermentación menor al requerido para alcanzar su fase estacionaria causa una fermentación ineficiente debido al crecimiento inadecuado de microorganismos, mientras que un tiempo de fermentación mayor al requerido para alcanzar su fase estacionaria produce un efecto tóxico en el desarrollo microbiano, especialmente cuando se trabaja en sistemas discontinuos debido a la alta concentración de etanol en el medio de fermentación. La fermentación completa se puede lograr a una temperatura más baja utilizando un tiempo de fermentación más largo, lo que da como resultado un rendimiento de etanol más bajo (Zabed *et al.*, 2014). Así mismo, la prolongación del tiempo de fermentación puede aumentar el costo de producción de etanol al aumentar el consumo de energía. El tiempo óptimo puede mejorar la productividad del etanol mediante la mitigación de la acumulación de productos secundarios, como los ácidos orgánicos y el glicerol, que pueden inhibir la actividad de las levaduras (Ma *et al.*, 2016a).

La velocidad de agitación del biorreactor controla la permeabilidad de los nutrientes desde el medio de fermentación al interior de las células y la eliminación del etanol de la célula al medio de fermentación. Cuanto mayor es la velocidad de agitación, mayor es la cantidad de

etanol producido. Además, aumenta la cantidad de consumo de azúcar y reduce la inhibición del etanol en las células. La tasa de agitación estándar para la fermentación por levaduras es de 150 a 200 rpm. Una velocidad de agitación excesiva limita las actividades metabólicas de las células disminuyendo la producción de etanol (Zabed *et al.*, 2014).

La concentración del inóculo utilizado no parece producir efectos significativos en la concentración final de etanol, pero afecta la tasa de consumo de azúcar y la productividad del etanol (Laopaiboon *et al.*, 2007). Según Zabed *et al.* (2014) la producción de etanol aumenta con el aumento en el número de células de 10^4 a 10^7 células por mL, pero no se da una producción significativa de etanol entre 10^7 y 10^8 células por mL. Esto se debe a que el aumento en la concentración celular dentro de unos ciertos márgenes reduce el tiempo de fermentación ya que las células crecen rápidamente y consumen azúcares produciendo etanol.

Todos estos factores causan que los rendimientos teóricos no sean alcanzados debido a que estas condiciones afectan la fisionomía y el metabolismo de los microorganismos. Bai *et al.* (2008) indicaron que las levaduras productoras de etanol son afectadas por presión osmótica (azúcar 25% p/v), estrés por etanol (15% p/v), ion Na^+ (>500 mg/L), ácido acético (>0,05% p/v), ácido láctico (>0,8 % p/v), sulfitos (>100 mg/L), $\text{pH} < 3,5$ (siendo el pH óptimo de 4,5-6,0). La optimización de los diversos factores de proceso que afectan la producción de etanol es de naturaleza compleja con una serie de parámetros de control interactivos. A nivel industrial, incluso una pequeña mejora en el proceso puede proporcionar un mejor rendimiento, lo que puede ser beneficioso comercialmente, haciendo del proceso de optimización un área clave de investigación en el campo de la biotecnología industrial. Los desafíos principales para comercializar los subproductos alimenticios para la tecnología de producción de bioetanol son la eficiencia energética y los beneficios de costos (Sen *et al.*, 2016).

El grado de interés de estos parámetros está en función de la aplicación del etanol obtenido, sí es para consumo humano (bebidas, cosméticos, farmacéutico) o sí va a ser utilizado como biocombustible (bioetanol y biodiesel).

Las levaduras a utilizarse en la producción de etanol deben cumplir durante la fermentación con algunas características deseables como tolerancia a concentraciones superiores a 20%

de sustrato, a concentraciones de etanol superiores a 17% las cuales se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Características deseables y no deseables para la selección de levaduras productoras de etanol.

Características deseables	Características no deseables
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Alta tolerancia al etanol ➤ Total degradación de los azúcares fermentables ➤ Resistencia al SO₂ ➤ Capacidad fermentativa a bajas temperaturas ➤ Máxima reducción de la fase de latencia ➤ Capacidad fermentativa a altas presiones 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Producción de SO₂ ➤ Producción de H₂S ➤ Producción de acidez volátil ➤ Producción de acetaldehído y piruvato ➤ Producción de espuma ➤ Producción de polifenoloxidasas

Fuente: Degree (1993).

1.4.2 Levaduras productoras de etanol

En el caso del suero de quesería como fuente para la producción de bioetanol, las especies más utilizadas en el proceso de fermentación se clasifican en: (1) las que utilizan directamente la lactosa para la producción de etanol: *Candida pseudotropicalis*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *Zymonas mobilis* (Guilmaraes *et al.*, 2010, Silveira *et al.*, 2005, Grba *et al.*, 2002); (2) las modificadas genéticamente con incorporación del gen que permite secretar la β -galactosidasa: *S. cerevisiae* expresando LAC4 y LAC12 de *K. lactis*, *S. cerevisiae* secretando β -galactosidasa de *A. niger*, *S. cerevisiae* expresando LAC2 de *E. coli*, híbrido de *S. cerevisiae* - *K. fragilis* (Guimarães *et al.*, 2010, Domingues *et al.*, 2002); (3) las que no utilizan directamente la lactosa y requieren como paso previo antes de la fermentación, la hidrólisis de la lactosa para la obtención de azúcares fermentables como glucosa y galactosa: *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. En estos casos, se adiciona al medio de fermentación la enzima β -galactosidasa bajo condiciones controladas de pH, temperatura y tiempo, hasta obtener el porcentaje de hidrólisis deseado (Sanchez & Cardona, 2008; Guimarães *et al.*, 2010). En esta revisión se describirán los aspectos y estudios más relevantes realizados

sobre las 3 levaduras que son objeto de la presente tesis doctoral (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *K. marxianus*) seleccionadas en base a la disponibilidad de cepas presentes en el mercado Venezolano y utilizadas en la fabricación de etanol.

1.4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un hongo ascomiceto que pertenece al género de las levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*. Microscópicamente las células se observan esféricas y ovoides, elipsoidales a veces cilíndricas y filamentosas de 2,5-10 μm de ancho y 4,5-21 μm de largo. La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales: los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies, pero presentan ausencia de hifas verdaderas. En presencia de oxígeno las cepas pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato (Fajardo & Sarmiento, 2008). La temperatura óptima de crecimiento de esta levadura es de 20-30 °C (Walker & Stewart, 2016). Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados. Tiene la capacidad de fermentar glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa, pero no fermenta la lactosa, y asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa, y puede tolerar hasta 250 mg/L de SO_2 . Esta levadura no puede crecer en condiciones estrictamente anaeróbicas, debido a que el oxígeno es absolutamente necesario como factor de crecimiento para la biosíntesis de ácidos grasos de membrana (p.e. ácido oleico) y esterol (p.e. ergosterol). *S. cerevisiae* es auxotrófica para el ácido oleico y el ergosterol en condiciones anaeróbicas, y así para fermentaciones alcohólicas efectivas, se puede suministrar algo de oxígeno al inicio de la fermentación y también se puede adicionar como complemento al medio de fermentación los ácidos grasos y factores de crecimiento de esteroides necesarios (Walker & Stewart, 2016), siendo la aireación óptima de la levadura de 0,6-0,9 vvm. *S. cerevisiae* se desarrolla bien entre pH 4,5 y 6,5 presentando una tolerancia bastante amplia de esta levadura a las variaciones de pH (Walker & Stewart, 2016). Con respecto a los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo, se observa formación de ácidos que influyen en el crecimiento celular, actividad enzimática y utilización de glucosa. Así, por ejemplo, algunas investigaciones han mostrado que con un pH inicial del medio a valores entre 4,0 y 4,5 se obtiene mejor crecimiento (Fajardo & Sarmiento, 2008).

Esta levadura es ampliamente utilizada en la industria de alimentos y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, fermenta la masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Folch-Mallol *et al.*, 2004), y es utilizada durante la fermentación de bebidas alcohólicas maduras como hidromiel, sidra, cerveza y vino, en bebidas maduras destiladas como ron, whisky y cognac, en bebidas alcohólicas no fermentadas como vodka, grappa y tsiporo, y en bebidas saborizadas como la ginebra (Walker *et al.*, 2016). El extenso conocimiento industrial y científico acumulado convierte a *S. cerevisiae* en uno de los organismos mejor estudiados. Es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial puesto que es un microorganismo (Fajardo & Sarmiento, 2008; Guimarães *et al.*, 2010): (1) de fácil manipulación y recuperación; (2) no es exigente en cuanto a su cultivo y no presenta alto costo; (3) posee una buena capacidad fermentativa hasta 20% etanol y tolera altas concentraciones de etanol (Antoni *et al.*, 2007; Cot *et al.*, 2007); (4) en la fermentación produce bajos niveles de subproductos; (5) es osmotolerante y capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares; (6) es capaz de crecer rápidamente en condiciones anaeróbicas, lo que ayuda a sortear los problemas de oxigenación inherentes a las fermentaciones industriales de gran volumen (Snoek & Steensma, 2006); (7) es microorganismo GRAS (generalmente considerado como seguro); (8) presenta alta viabilidad celular para el reciclado con la posibilidad de utilizar su biomasa como alimento para animales (coproducto), que es importante para la economía de procesos industriales (Bai *et al.*, 2008); y (9) buenas características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior. Sin embargo, las cepas de *S. cerevisiae* naturales o salvajes son incapaces de metabolizar la lactosa, y así las aplicaciones de esta levadura en fermentaciones de suero de quesería involucra la prehidrólisis de la lactosa y la fermentación adicional de la mezcla resultante de glucosa y galactosa. Debido al fenómeno de la represión del catabolito (Gancedo, 1998), *S. cerevisiae* consume glucosa preferentemente a galactosa, lo que resulta, en la mayoría de los casos, en fermentaciones prolongadas con un retraso diauxico después del agotamiento de la glucosa y antes de la fermentación de galactosa, que es, en general, bastante lenta (O'Leary *et al.*, 1977; Mehaia & Cheryan, 1990). Algunos autores han propuesto el uso de la enzima β -galactosidasa co-

inmovilizada con células de *S. cerevisiae* como alternativa para las fermentaciones de suero (Hahn-Hägerdal, 1985; Roukas & Lazarides, 1991). Hahn-Hägerdal (1985) mostró que *S. cerevisiae* inmovilizado en alginato de calcio conjuntamente con β -galactosidasa es capaz de producir mayores cantidades de etanol (52 g/L) y mejorar su productividad (4,5 g/L h) en suero concentrado (15% sustrato), en comparación con las células inmovilizadas de *K. fragilis* (concentración de etanol de 13 g/L y productividad de 1,1 g/L h).

Dominguez *et al.* (2001) trabajaron con una cepa de *S. cerevisiae* expresando LAC4 (que codifica para β -galactosidasa) y LAC12 (que codifica para lactosa permeasa), utilizando permeados de suero de queso con concentraciones de 5% de lactosa en frascos con agitación, obteniendo una productividad de etanol de 0,68 g/L h y un rendimiento de etanol de 21 g/L. Estos autores también trabajaron con permeados de suero de queso con concentraciones de 10% de lactosa, utilizando bioreactores por proceso con capacidad de 2 L, obteniendo una productividad de etanol de 1,8 g/L h y un rendimiento de etanol de 53 g/L. Dominguez *et al.* (2005) trabajaron con una cepa de *S. cerevisiae* y β -galactosidasa (origen *A. niger*), utilizando un medio semisintético con 5% de lactosa en bioreactor continuo de 6 L y suministro de aire, obteniendo una productividad de etanol de 9 g/L h y un rendimiento de etanol de 20 g/L.

Algunos de los enfoques empleados para diseñar cepas de *S. cerevisiae* para mejorar la fermentación del etanol comprenden: híbridos en desarrollo de cepas de *S. cerevisiae* y *K. lactis*, capaces de utilizar lactosa, utilizando la fusión de protoplastos (Farahnak *et al.*, 1986); sin embargo, estas cepas recombinantes presentan una estabilidad genética reducida. Otro método que ha sido empleado es la clonación de los genes de la β -galactosidasa y de la lactosa permeasa de *K. lactis*, en *S. cerevisiae* (Sreekrishna & Dickson, 1985). Otros enfoques han incluido la creación de células de *S. cerevisiae* que liberan β -galactosidasa en el medio de cultivo, ya sea por secreción (Kumar *et al.*, 1992) o debido a la lisis de células recombinantes, a través de la sobreexpresión del activador transcripcional GAL4 (Porro *et al.*, 1992). Además, la clonación de los genes de galactosidasa y permeasa lactosa de *Candida pseudotropicalis*, en células de *S. cerevisiae*, y su consiguiente expresión ha sido llevado a cabo por Tretiak *et al.* (1998). Sin embargo, estos procesos centrados en el diseño de células de *S. cerevisiae* han mostrado una productividad de etanol relativamente baja. En otro método, una cepa floculante recombinante de *S. cerevisiae* que expresa el LAC4 y

LAC12 de *K. lactis* se utilizó para la producción de etanol a partir de lactosa en una operación de cultivo continuo obteniendo una alta productividad (rendimiento de bioconversión del 60% del valor teórico: 0,51 g etanol/g lactosa), proporcionando nuevas perspectivas sobre el desarrollo de un proceso a gran escala económicamente viable de producción de bioetanol a partir de suero (Domingues *et al.*, 1999). Guimarães *et al.* (2008a) trabajaron con una cepa de *S. cerevisiae* expresando LAC4 y LAC12 en soluciones de concentrado de suero en polvo con 15% de lactosa y utilizando bioreactores por proceso con capacidad de 2 L, obteniendo una productividad de etanol de 0,46 g/L h y un rendimiento de etanol de 55 g/L. Otro estudio examinó el rendimiento de una cepa de *S. cerevisiae* recombinante, que expresaba lactasa permeasa y β -galactosidasa intracelular de *K. lactis*, en fermentaciones de soluciones de suero de queso en polvo concentrado y desproteinizado bajo los efectos de la suplementación con un hidrolizado de maíz o licor de maíz (Silva *et al.*, 2012). El estudio concluyó que la suplementación de 10 g/L de licor de maíz mejoró considerablemente la fermentación de suero, lo que resultó en la producción de 7,4% (v/v) de etanol a partir de 150 g/L de lactosa inicial en fermentaciones llevadas a cabo en matraces de agitación, con una productividad correspondiente de 1,2 g/L h.

1.4.2.2 *Saccharomyces bayanus* (*S. uvarum*, *S. oviformis*)

Es un hongo ascomiceto, teleomorfo que pertenece al género de las levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*, fermenta la glucosa y rafinosa, no asimila los nitratos o nitritos, su crecimiento es afectado en medios de fermentación libres de vitaminas, y algunas cepas requieren biotina y/o tiamina. Esta levadura es generalmente galactosa negativa y es sensible a altas concentraciones de glucosa y NaCl, es tolerante a altas concentraciones de etanol (17%), puede tolerar hasta 250 mg/L de SO₂, y su temperatura óptima de crecimiento es de 12-32 °C (Naumov *et al.*, 2001; Oenofrance, 2018). Las bodegas modernas a gran escala adquieren cultivos puros de cepas de *S. bayanus* de compañías especializadas en el suministro de levaduras para ser utilizadas en la elaboración de vinos (Walker & Stewart, 2016). Esta levadura es empleada ampliamente en la fermentación del mosto en la industria vinícola y es la cepa típica de las etapas finales de la fermentación, a menudo la responsable de refermentaciones de vinos embotellados (Mesas & Alegre, 2009; Oenofrance, 2018), también es utilizada en la elaboración de vinos blancos, rosados y tintos, así como cuando se requiera retomar la fermentación alcohólica tras una parada de

fermentación (Oneofrance, 2018). También ha sido empleada en la fermentación de sueros de quesería, siendo necesario realizar la degradación enzimática de la lactosa en el suero por la β -galactosidasa permitiendo intensificar la fermentación alcohólica, aumentando la disponibilidad de azúcares y la posibilidad de aplicar cepas de bacterias que no fermentan la lactosa, que se utilizan tradicionalmente en la producción de bebidas alcohólicas. *S. bayanus* se puede utilizar en la producción de bebidas carbonatadas hechas de suero con un contenido natural de lactosa y de suero bajo en lactosa. Znamirowska *et al.* (2017) mostraron que, tras 28 días de fermentación, el contenido de alcohol en bebidas con bajo contenido de lactosa fue un 1% más alto en comparación con el de las bebidas de suero con el contenido natural de lactosa (9,50 y 8,50%, respectivamente).

1.4.2.3. *Kluyveromyces marxianus*

Durante los últimos 40 años, diversos autores han abordado la producción de etanol a partir de la lactosa, refiriéndose principalmente a las levaduras *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus* y *Candida pseudotropicalis*. Sin embargo, en la edición más reciente de *The Yeasts*, un estudio taxonómico (Kurtzman & Fell, 1998), muestra que todas ellas son sinónimas de *K. marxianus* (Lachance, 1998). *K. fragilis* y *K. marxianus* han sido consideradas especies separadas durante mucho tiempo, pero *K. fragilis* ahora está incluida en la especie *K. marxianus* (Fonseca *et al.*, 2008; Lachance, 1998), y *C. pseudotropicalis* (sinónimo de *Candida kefir*) es la forma anamorfa (asexual) de *K. marxianus* (Lachance, 1998).

Kluyveromyces marxianus var. *marxianus* adopta forma esferoidal, ovoide, elipsoidal, y ocasionalmente cilíndrica, tiene un tamaño de 4 a 8 μm , se reproduce por división y forma pequeños grupos o cadenas de células. Las colonias son de color marrón crema, lisas, extensas. La levadura ha sido empleada para la producción de biomasa, enzimas (incluyendo β -galactosidasa), etanol, oligonucleótidos (utilizados como potenciadores del sabor en productos alimenticios), oligosacáridos (utilizados como prebióticos para estimular el crecimiento de *Bifidobacterium* sp. en los intestinos de animales y humanos), y por último oligopéptidos, inmunoestimuladores agregados a los productos lácteos que se liberan en el mosto después de la proteólisis de la proteína de suero (Rajoka *et al.*, 2003; Belem & Lee, 2010).

Existen numerosos estudios de fermentación alcohólica de lactosa/suero de leche utilizando levaduras *Kluyveromyces* spp. La gran mayoría de estos informes mencionan las especies *K. marxianus* y *K. fragilis*, que actualmente son sinónimos. Las condiciones de operación de *K. marxianus* en comparación a las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus* se describen en la Tabla 6, donde se relaciona temperatura de crecimiento y operación, pH, tipos de sustrato que fermentan e inhibición por concentración de sustrato, así como los subproductos que se generan durante el proceso de fermentación. El control de estos parámetros durante la fermentación en el bioreactor, inciden directamente en rendimientos de etanol producido como en la rentabilidad de la operación.

Kluyveromyces marxianus es la levadura fermentadora de la lactosa para producir etanol destinado a ginebra, vodka y licores de crema (Walker & Stewart, 2016). Grba *et al.* (2002) trabajaron con una cepa de *K. marxianus*, utilizando suero desproteinizado con 10% de lactosa más extracto de levadura en bioreactores con capacidad de 2 L por proceso, obteniendo una productividad de etanol de 3,10 g/L h y un rendimiento de etanol de 43 g/L. Silveira *et al.* (2005) trabajando con una cepa de *K. marxianus* y una solución de permeado de suero con 17% de lactosa en un bioreactor con capacidad de 2 L por proceso, obtuvieron una productividad de etanol de 4,90 g/L h y un rendimiento de etanol de 59 g/L. Kargi & Ozmihci (2006) trabajaron con una cepa de *K. marxianus*, utilizando una solución concentrada de suero en polvo con 15% de lactosa y frascos con agitación, obteniendo una productividad de etanol de 0,40 g/L h y un rendimiento de etanol de 80 g/L. Ozmihci & Kargi (2007b) mostraron que una cepa de *K. marxianus* y una solución concentrada de suero en polvo con 10% de lactosa, utilizando un bioreactor continuo con capacidad de 5 L es capaz de obtener una productividad de etanol de 0,74 g/L h y un rendimiento de etanol de 32 g/L. Ozmihci & Kargi (2008) también con una cepa de *K. marxianus* en una solución de suero en polvo con 5% de lactosa, y utilizando columnas empacadas continuas, obtuvieron una productividad de etanol de 0,4 g/L h y un rendimiento de etanol de 20 g/L. Zafar *et al.* (2005) fermentaron suero con *K. marxianus* MTCC 1288 a diferentes concentraciones de lactosa a temperatura y pH constantes, mostrando un aumento en la producción de etanol de 0,618 g/L a 3,98 g/L con el aumento en la concentración de sustrato de 10 g/L a 50 g/L. Zafar & Owais (2006) emplearon *K. marxianus* MTCC 1288 para examinar la cinética de producción de etanol y la producción de biomasa a partir de

suero crudo, metabolizándose la mayor parte de la lactosa en 22 h para dar 2,10 g de etanol/L y 8,9 g de biomasa/L.

Un estudio que comparó la eficiencia de diferentes cepas (*K. marxianus* NRRL-1109, *K. marxianus* NRRL-1195 y *K. marxianus* DSMZ-7239) cultivadas en solución de concentrado de proteína de suero, mostró que la cepa DSMZ-7239 fue la más eficiente, produciendo la tasa más alta y grado de formación de etanol de 3,3% (v/v) (Ozmihci & Kargi, 2007a). Otro estudio comparativo de 6 cepas de levaduras cultivadas a diferentes concentraciones de extracto de levadura y masa celular, y en diferentes condiciones aeróbicas, dio a conocer que la cepa más efectiva, *K. lactis* NBRC 1903, produjo una concentración de etanol máxima de 63,7 g/L a las 24 h en cultivo discontinuo, y que el nivel de oxígeno disuelto fue importante en la producción de etanol (Toyoda & Ohtaguchi, 2008).

Tabla 6. Propiedades y condiciones de fermentación para las levadura *S. bayanus*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae*.

Autores	<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Naumov <i>et al.</i> (2001); Fajardo & Sarmientos (2008); Dragone <i>et al.</i> (2011); Vidgren & Lomdesborough (2012); Dolmar (2018)	Sustrato: glucosa, maltosa, maltotriosa, galactosa, fructosa, sacarosa, trehalosa y melobiosa.	Sustrato: glucosa, galactosa, sucrosa, rafinosa; variable: maltosa, lactosa, trehalosa, inulina.	Sustrato: glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa, galactosa y asimila la rafinosa.
Fohl-Mallol <i>et al.</i> (2004); Zafar <i>et al.</i> (2005); Dinitz <i>et al.</i> (2014); Dolmar (2018)	Inhibición por sustrato: ≥ 286 g/L	Inhibición por sustrato: ≥ 250 g/L	Inhibición por sustrato: ≥ 300 g/L
Dinitz <i>et al.</i> (2014); Astudillo (2010); Walker & Stewart (2016); Dolmar (2018)	pH fermentación: 3,50-6,00	pH fermentación: 4,5-6,5	pH fermentación: 4,00-6,50
Naumov <i>et al.</i> (2001); Astudillo (2010); Dinitz <i>et al.</i> (2014); Dolmar (2018)	Temperatura óptima: 12-32 °C	Temperatura óptima: 37 °C	Temperatura óptima: 28-35 °C
Guimarães <i>et al.</i> (2010); Dinitz <i>et al.</i> (2014); Dolmar (2018)	Temperatura operación: 15-30 °C	Temperatura operación: 30- 45 °C	Temperatura operación: 28-35 °C
Silveira <i>et al.</i> (2005); Antoni <i>et al.</i> (2007); Cot <i>et al.</i> (2007); Guimarães <i>et al.</i> (2010); Dolmar (2018); Oenofrance (2018)	Inhibición completa por etanol: 170 g/L	Inhibición completa por etanol: 80 g/L	Inhibición completa por etanol: 200 g/L
Merico <i>et al.</i> (2009); Dinitz <i>et al.</i> (2014)	Requerimientos oxígeno: Anaeróbico	Requerimientos oxígeno: Anaeróbico	Requerimientos oxígeno: 0,05–0,1 mmHg
Claasen <i>et al.</i> (1999); Dragone <i>et al.</i> (2011)	Rendimiento teórico: 0,538 g etanol/g glucosa	Rendimiento teórico: 0,533 g etanol/g glucosa	Rendimiento teórico: 0,51 g etanol/g glucosa
Dolmar (2018)	Producción de acetaldehído y ácido pirúvico: Baja	Producción de acetaldehído y ácido pirúvico: baja	Producción de acetaldehído y ácido pirúvico: baja

1.5. Biorreactores

Los biorreactores son tanques cilíndricos de acero inoxidable que pueden almacenar hasta 50.000 L de producto donde se produce el proceso de fermentación bajo condiciones controladas de temperatura, al estar provistos de camisas (serpentines o chaquetas huecas) por donde circula agua helada u otro refrigerante. Su diseño también permite regular la presión de CO₂ y transportar el CO₂ de manera controlada al ambiente. El diseño de biorreactores debe estar enfocado en mejoras en el control del proceso, diseño aséptico que facilite su limpieza y desinfección, selección de materiales que optimicen la transferencia de calor y permitan reducir el costo de operación (Cooney, 1983) y según la capacidad de producción requerida a nivel industrial, se pueden clasificar en flujo continuo y discontinuos (*batch*).

1.5.1 Biorreactores de flujo continuo perfectamente agitados

Los reactores continuos de mezcla perfecta, con entrada y salida continua de sustrato y producto, que trabajan en estado estacionario, siendo una de sus características principales el tiempo mínimo de residencia (ζ) del medio de fermentación en el biorreactor (Figura 6), con la finalidad de asegurar que se realice la fermentación de los azúcares para la obtención de etanol en las cantidades óptimas requeridas. El uso de reactores continuos permite obtener excelentes rendimientos de etanol, una mayor productividad, un uso más eficiente de los equipos y facilidad en la automatización de los procesos. Como desventaja se requiere mayor esterilidad en el proceso por tener un mayor riesgo de contaminación, incidiendo directamente en los costos de higiene y saneamiento.

La destilación continua se usa a menudo para la fabricación de etanol a gran escala y se ha aplicado a la destilación de suero de quesería a nivel industrial en Irlanda y Nueva Zelanda (Ling, 2008). Uno de los sistemas industriales que utiliza sueros y permeados de quesería y biorreactores continuos es el proceso industrial de Dansk Gaerings, el cual utiliza a *Streptococcus fragilis* como microorganismo productor de etanol. En este sistema, y a partir de 42 dm³ de permeado de suero conteniendo 4,4% de lactosa, es capaz de producir 1 dm³ de etanol, siendo la eficiencia de fermentación aproximadamente $\eta = 0,8$ (Fischbach, 1987). Otro sistema continuo aplicado a los sueros y permeados de quesería es el proceso

Milbrew, que tiene como objetivo la producción de proteína celular y etanol, utilizando *K. fragilis* NURL Y1109 (Delaney, 1981).

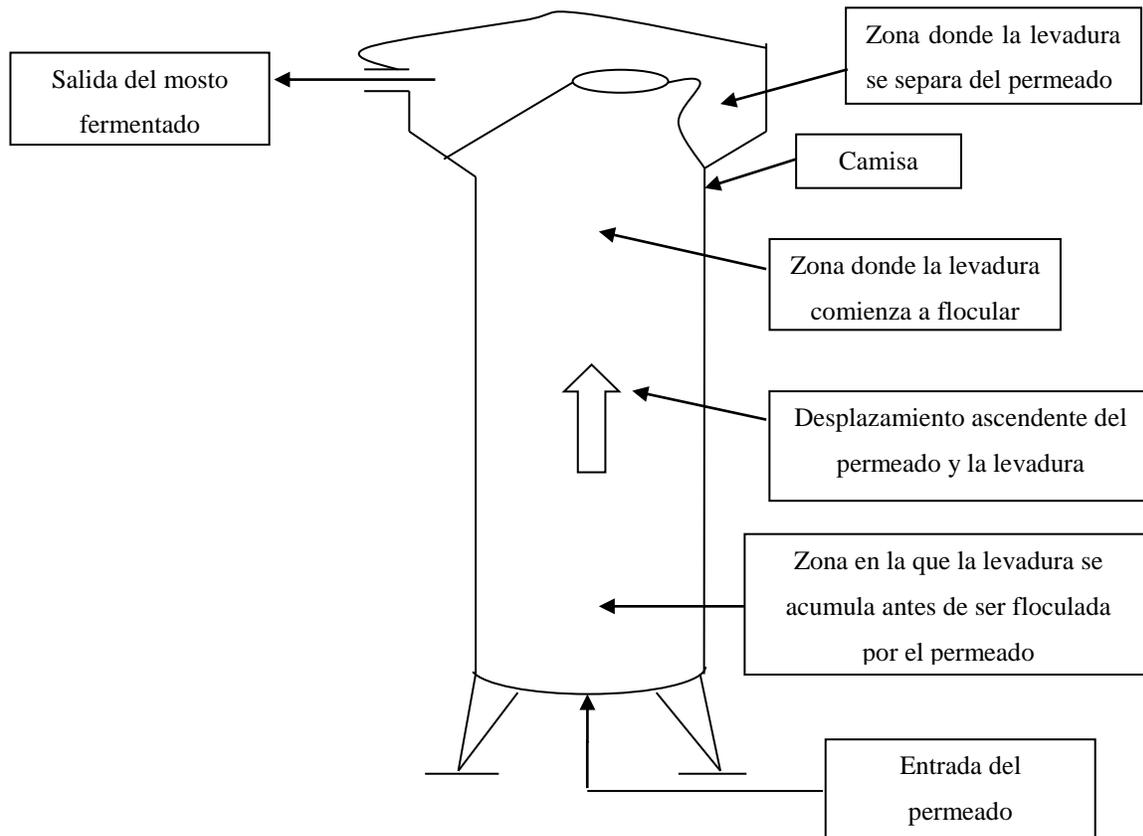


Figura 6. Sistema continuo de fermentación.

Fuente: Hough (1990).

En la Tabla 7 se presentan otros autores que en sus estudios han utilizado bioreactores continuos para producir etanol a partir de suero de quesería.

Tabla 7. Obtención de etanol a partir de suero de quesería utilizando bioreactores continuos.

Autor	Levadura	Medio de fermentación
Domingues <i>et al.</i> (2005)	<i>S. cerevisiae</i> expresando LAC4	Medio semisintético de lactosa la 5%
Ozmihci & Kargi (2007b)	<i>K. marxianus</i>	Concentrado de suero en polvo al 10% de lactosa
Ozmihci & Kargi (2008)	<i>K. marxianus</i>	Concentrado de suero en polvo al 5% de lactosa

1.5.2 Bioreactores discontinuos de mezcla perfecta (*batch*)

Los bioreactores discontinuos se caracterizan por la ausencia de flujos tanto de entrada como de salida durante la reacción de fermentación y son tanques construidos por lo general de acero inoxidable de gran capacidad, dotados de camisas de refrigeración que permiten mantener la temperatura de fermentación dentro del intervalo óptimo de la levadura, así como de sistema de limpieza CIP que garantiza desinfección de los tanques antes de ser usados (Figura 7).

Los tanques de fermentación pueden ser clasificados a escala industrial en tanques abiertos o cerrados. Los tanques abiertos no son apropiados para espacios cerrados por la acumulación de CO₂ en el ambiente producto de la fermentación, pudiendo alcanzar hasta un 4% en el aire y provocando asfixia en breve tiempo a las personas que esten expuestas (regulaciones internacionales establecen hasta un 0,5% de CO₂ en área donde trabajan los operadores). Los tanques cerrados permiten controlar el CO₂ producido durante la fermentación, almacenarlo y utilizarlo en aplicaciones posteriores dentro del mismo proceso o como un subproducto de la producción de etanol.

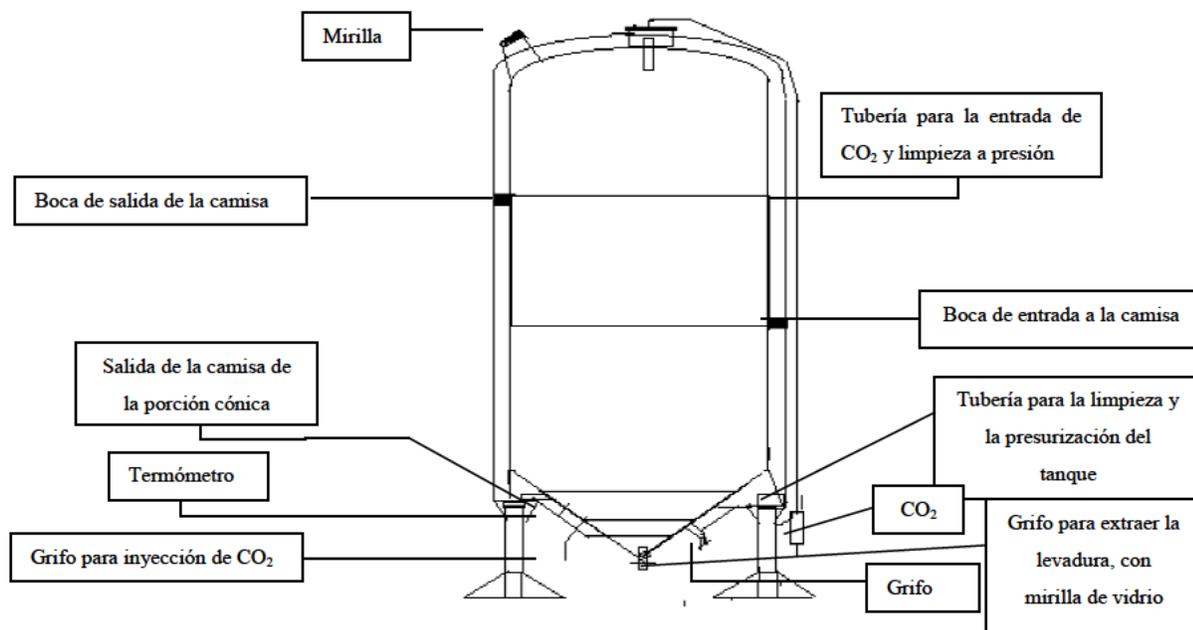


Figura 7. Sistema discontinuo de fermentación.

Fuente: Hough (1990).

El proceso Carbery es un sistema de producción de etanol a partir de sueros y permeados de quesería, y se caracteriza por incluir una serie de tanques fermentadores discontinuos y un proceso de destilación continuo. En este sistema se bombea un permeado rico en lactosa obtenidos en procesos de ultrafiltración de sueros de quesería a cada uno de los 8 tanques fermentadores. La levadura se añade a cada recipiente de fermentación al comienzo del llenado del recipiente. Las condiciones en cada recipiente se establecen para permitir la conversión rápida y eficiente de la lactosa en etanol, y el proceso de fermentación se completa en 24 h. La levadura utilizada durante la fermentación se recupera al final de la fermentación mediante decantación y clarificación mecánica y es reutilizada varias veces antes de desecharla. Al final de la fermentación, el nivel de etanol obtenido es del 3,5-4,2%, con calidad de grado alimenticio y su destilado (96,5% de etanol) se destina principalmente a la fabricación de licores (Fischbach, 1987). La eficiencia de la fermentación es de aproximadamente $\eta = 0,86$ (Kessler, 1996).

Un hecho importante es que la planta más grande del mundo para la obtención de etanol a partir de suero de quesería, procesa diariamente 600.000 L de suero. Carbery en Irlanda trabaja con suero sin concentrar con 4,5% de lactosa, obteniendo un caldo que en promedio

contiene 2,8% de etanol, el cual destila para obtener 22.000 L por día de alcohol potable. No obstante, una planta de esta naturaleza requiere procesar al menos 500.000 L por día de suero, de manera que la operación sea económicamente favorable permitiendo una recuperación anual de la inversión del 28%. Ling (2008) en su trabajo de suero a etanol indicó que el proceso Carbery desarrollado en Irlanda por la empresa Carbery, ha sido adoptado por plantas en Nueva Zelanda y Estados Unidos para la producción de etanol a partir de suero de quesería, el cual es utilizado en la elaboración de biocombustibles. En los Estados Unidos, durante el año 1972 se desarrolló el proceso Milbrew para producir biomasa celular y etanol a partir de suero de quesería empleando la levadura *Kluveromyces fragilis* que utiliza el 95% de lactosa de suero no concentrado con una eficiencia de conversión del 80-85% a etanol. Este proceso tiene altos costos de destilación (Ling, 2008).

La mayoría de los trabajos consultados sobre la producción de etanol a partir de sueros y permeados dulces y ácidos, obtenidos a partir de concentrados de proteína de suero y medios de fermentación sintético elaborados a partir de lactosa pura calidad de laboratorio, han sido realizados en bioreactores discontinuos por ser el método de fermentación que mejor se adapta a las condiciones de los laboratorios de investigación de las universidades y centros de investigación. En la Tabla 8 se presentan algunos autores que han utilizado bioreactores discontinuos en sus experiencias para producir etanol a partir de suero de quesería.

Tabla 8. Obtención de etanol a partir de suero de quesería utilizando bioreactores discontinuos.

Autor	Levadura	Medio de fermentación
Grba <i>et al.</i> (2002)	<i>K. marxianus</i>	Suero desproteínizado más extracto de levadura y sales al 10% de lactosa
Domingues <i>et al.</i> (2002)	<i>S. cerevisiae</i> secretando β -galactosidasa	Medio de lactosa al 5%
Silveira <i>et al.</i> (2005)	<i>K. marxianus</i>	Permeado de suero al 17% de lactosa
Guimarães <i>et al.</i> (2008c)	<i>S. cerevisiae</i> secretando LAC4-LAC12	Medio tamponado con 15% de lactosa
Dragone <i>et al.</i> (2011)	<i>K. fragilis</i>	Concentrados de suero de quesería con 5 a 15% lactosa
Ariyanti & Hadiyanto (2012)	<i>K. marxianus</i>	Suero de quesería con 4,5-5,0% de lactosa
Vincenzi <i>et al.</i> (2014)	<i>K. marxianus</i> <i>K. lactis</i>	Permeado de suero de quesería con 4,765% de lactosa

1.6. SEPARACIÓN DEL ETANOL DURANTE LA DESTILACIÓN Y USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1.6.1 Procesos tecnológicos para la obtención de etanol

La línea industrial de producción de etanol a partir de suero de quesería (Figura 8), involucra un montaje con la siguiente disposición y equipos: (1) tanque de almacenamiento del medio de fermentación; (2) tanque para pasteurización del medio de fermentación (también se puede utilizar una placa de pasteurización); (3) biorreactor discontinuo por batch para realizar la fermentación; (4) tanque de almacenamiento de dióxido de carbono; (5) separador de sólidos como levaduras producidas durante la fermentación y compuestos precipitados durante de la producción de etanol; (6) destilador de columna fraccionada por platos para obtener los diferentes alcoholes, separados por punto de ebullición (compuestos más livianos se separan de los más pesados durante la destilación); (7) tanque para almacenamiento de sólidos; (8) tanque de almacenamiento de alcohol y (9) recuperación de

la vinaza con los sólidos obtenidos de la separación que pueden ser utilizados para alimentación animal.

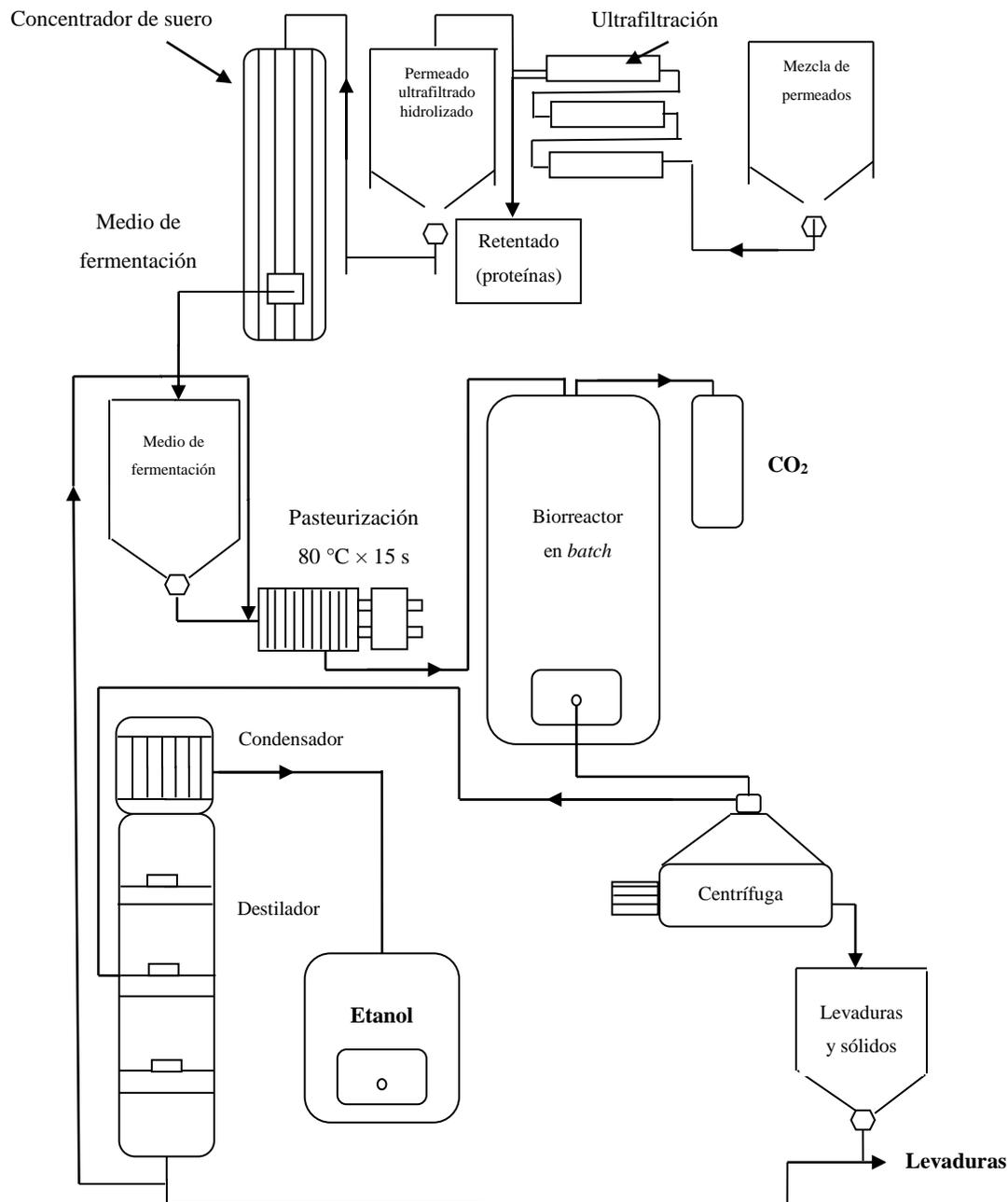


Figura 8. Línea de producción de etanol a partir de sueros/permeados de quesería.
Fuente: Pasterizadora Táchira (2018).

En Venezuela, Cervecería Polar recupera el dióxido de carbono producido de la fermentación y procede a su licuefacción, transformándolo en un producto adicional del proceso de fermentación con alto valor añadido, que ellos utilizan dentro de sus tecnologías de fábrica. En el caso de las vinazas son utilizadas en alimentación animal, aun cuando sigue siendo un residuo sobre el cual hay que realizar investigación con la finalidad de obtener productos con mayor valor agregado

Las columnas de destilación fraccionadas son utilizadas para la separación de compuestos volátiles en base a su punto de ebullición. Las columnas se dividen en una cantidad determinada de compartimientos (platos, que son calculados según el producto de interés a separar), que ejercen resistencia a los compuestos que fluyen en estado gaseoso, a través de la columna, permitiendo que los más livianos y con puntos de ebullición más bajos, asciendan más rápido, logrando su separación de los más pesados y con puntos de ebullición más altos que tienden a condensar al chocar con los platos, fluyendo hacia el hervidor donde se calientan y pasan a estado gaseoso, volviendo a fluir a través de la columna hasta alcanzar el condensador, permitiendo su separación de otros compuestos.

La columna de destilación (Figura 9) está dividida en dos secciones: agotamiento y rectificación, siendo en la parte central la alimentación del compuesto a destilar. El equipo consta de un hervidor que incrementa la temperatura del compuesto hasta alcanzar el punto de ebullición, fluyendo a través de los platos de la sección de agotamiento y rectificación hasta el condensador que reduce su temperatura hasta pasar al estado líquido. Por el fondo de la columna se retira la vinaza que corresponde al residuo del proceso de destilación con muy bajo contenido de etanol. Los diseños y fabricación de columnas de destilación se han vuelto más eficientes, permitiendo reducir el tamaño y el costo de las mismas.

Empresas como APV International (West Sussex, Reino Unido) y Alfa Laval (Hamburg, Alemania) producen plantas apropiadas para la producción de etanol a partir de sueros y permeados de quesería (Fischbach, 1987), y Wenzhou Mibond Machinery CO., Ltd, DYE (Zhejiang, China) producen equipos de destilación según los requerimientos del cliente.

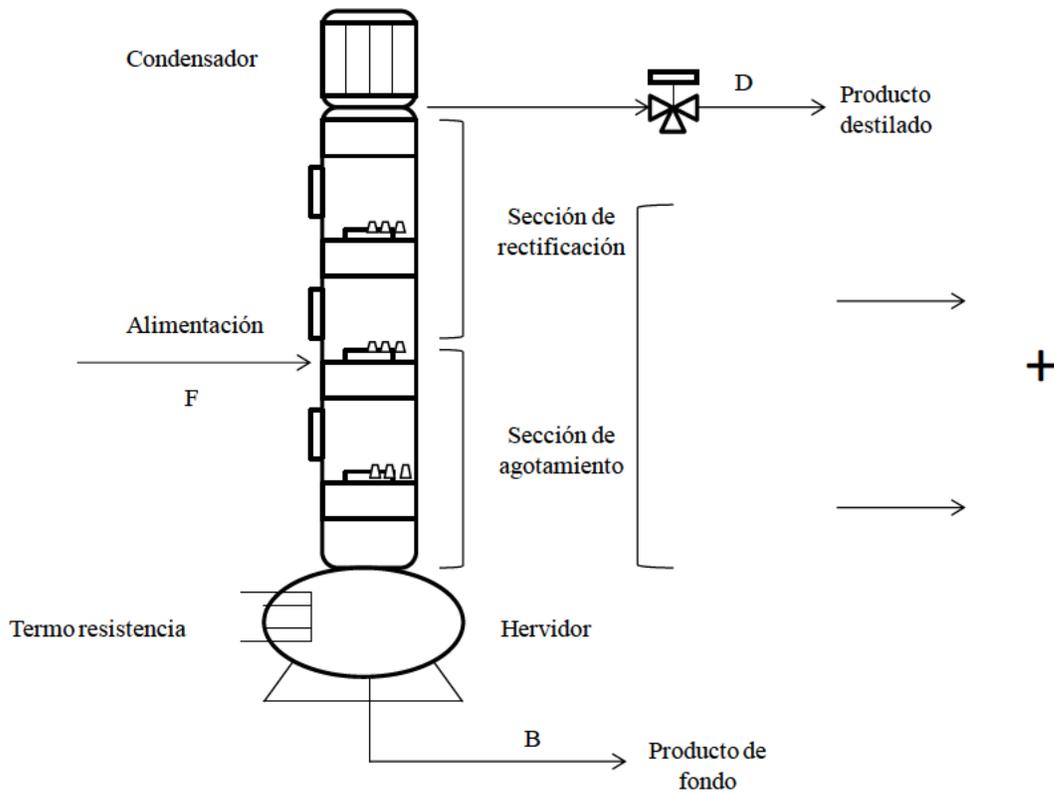


Figura 9. Columna de destilación fraccionada de uso industrial.

Fuente: Treybal (2001).

Coton (1980) evaluó la producción de etanol a partir de suero de quesería en 1980 y calculó para Reino Unido un provecho de 107 libras/1000 kg de lactosa. Este estudio también señala que, ya que el mercado del etanol está muy limitado en su uso en la fabricación de vinagre y bebidas, generalmente existe una fuerte competencia entre el etanol producido a partir de melaza y otras fuentes. Por lo tanto, la producción de etanol a partir del permeado de suero para la producción de bebidas alcohólicas es solo económicamente atractiva en ciertos casos. Hoy los costes de producción del bioetanol varían entre 0,15 y 1,07 €/dm³, dependiendo de la materia prima. El precio disponible en el mercado hoy en día para el etanol industrial es de alrededor de 0,5 €/dm³. Así, la viabilidad económica de la producción a partir de permeados de suero de quesería debe evaluarse críticamente en cada caso por factores locales y subjetivos pertinentes.

1.6.2 Calidad del etanol obtenido

Los aspectos de calidad de las bebidas alcohólicas están regulados por las normativas técnicas de cada país, y en el caso de Venezuela es la norma COVENIN 3340:1997 sobre bebidas alcohólicas, la que especifica los requerimientos de calidad que debe cumplir el producto obtenido. La norma hace énfasis en la graduación alcohólica según el tipo de bebida elaborada dentro del territorio de Venezuela, y en el caso de bebidas importadas, hace referencia a que las mismas deben cumplir con las normas técnicas de calidad del país de origen donde fueron elaboradas. Con respecto a los requisitos físico-químicos, esta norma hace enfoque en la determinación de sustancias producidas durante la fermentación o adicionadas al producto terminado como sustancias adulterantes, y entre estas se encuentra el metanol, congénicos (ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores) que pueden provocar intoxicaciones o son peligrosas para la salud de los consumidores.

La calidad y rendimiento del etanol va a depender de las condiciones de proceso aplicadas al suero de quesería desde su recolección hasta la obtención del etanol por destilación. El permeado concentrado de suero de quesería como medio de fermentación puede ser contaminado por microorganismos que se desarrollan en el suero como *Acetobacter pasteurianus* que produce ácido acético a partir de etanol durante el proceso de fermentación (Mostafa, 2001; Nielsen *et al.*, 2003; Baena-Ruano *et al.*, 2010). *Lactobacillus helveticus*, *Lb. bulgaricus* y *Lb. casei* son microorganismos que producen ácido láctico a partir de la lactosa presente en el suero de quesería (Boontawan, 2011; Soriano *et al.*, 2012; Eldeleklioglu *et al.*, 2013; Rojas *et al.*, 2015) y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. aurantibutyricum* son microorganismos que producen butanol a partir de suero de quesería (Liu & Fan, 2004; Bohlman, 2007; Cascone, 2008). Así, durante la preparación del medio de fermentación y durante la fermentación debe cuidarse las condiciones higiénicas de proceso, asegurando que se realice la pasteurización del medio de fermentación bajo las condiciones de tiempo y temperatura requeridas, limpieza, desinfección de equipos, preparación y adición de inóculos, de esta manera se evita la obtención de productos no deseados durante la fermentación, originados por bacterias contaminantes que compiten por el sustrato con las levaduras, afectando los rendimientos esperados de etanol. Por otra parte, un correcto funcionamiento de la columna de destilación fraccionada asegura la separación por

temperatura de ebullición de los éteres, esteres, aldehídos-cetonas, metanol, etanol y alcoholes superiores (terbutanol, isopropanol, n-butanol, 2- metil butanol, 3-metil butanol, isobutanol, n-propanol) que se producen durante la fermentación.

En fermentaciones deficientes se pueden originar sustancias consideradas peligrosas para la salud humana como el furfural y el acetaldehído. El aldehído aromático furfural se produce en fermentaciones de granos (cereales), puede producir toxicidad aguda por contacto con la piel o al ser ingerida, y es considerado un carcinogénico categoría 2 (Merck, 2017), regulándose su presencia para consumo humano hasta 6 mg de furfural por cada 100 mL de alcohol anhidro (COVENIN 3662, 2001). El acetaldehído representa cerca del 90% de los aldehídos formados durante el proceso de fermentación, y su concentración depende en parte del tipo de levaduras y del proceso de destilación utilizado. Se permite hasta 40 mg de acetaldehído por cada 100 mL de alcohol anhidro (COVENIN 3662, 2001).

Las bebidas alcohólicas adulteradas son aquellas cuya naturaleza o composición no corresponden con las que se describen en su etiqueta, anuncia, expende o suministra, cuando no coincida con las especificaciones de su denominación, o cuando haya sufrido tratamiento que disimule su alteración o se encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas, de manera natural o intencional (SACS, 2017). La adulteración más común del etanol como producto terminado es la adición de agua, la cual es permitida en niveles bajos, porque el etanol se mezcla fácilmente con agua y esto es difícil de detectar visualmente (Neto *et al.*, 2014). Otra adulteración muy utilizada es la adición de metanol por su bajo costo con respecto al etanol (Silva *et al.*, 2012), es considerada peligrosa para la salud humana al transformarse en el hígado en formaldehído, y por oxidaciones sucesivas a través de una vía dependiente de tetrahidrofurano se transforma en ácido fórmico y dióxido de carbono, siendo el ácido fórmico el metabolito tóxico responsable al inhibir la citocromo oxidasa, interfiriendo en el transporte de electrones en la cadena respiratoria, inhibiendo la función mitocondrial de la retina y aumentando el estrés oxidativo, provocando intoxicaciones, las cuales se clasifican de acuerdo a los niveles de concentración de metanol en sangre. Las intoxicaciones más severas se presentan cuando se alcanzan concentraciones de metanol en sangre >50 mg/dL y <100 mg/dL que provocan cuadros comatosos, respiración rápida y superficial, edema de papila, convulsiones, cianosis periférica y central, hipotensión y ceguera, y en casos donde

el consumo de metanol es superior a 100 mg/dL de sangre, las metanolemias son letales (Castellanos *et al.*, 2009). El etanol y metanol son dos alcoholes con características físico-químicas similares, ya que ambos son traslúcidos, solubles en agua y sus densidades son similares (Pereira *et al.*, 2013), aunado a que el metanol tiene un costo más bajo que el etanol, hace que este último haya sido utilizado en adulteración de bebidas alcohólicas, generando un problema de salud pública.

Cuando se trabaja con medios de fermentación con concentraciones superiores a 180 g/L de azúcares reductores, el crecimiento y la viabilidad de la levadura decrece debido al stress osmótico y a la presencia de algunos inhibidores, tales como el etanol, CO₂, ácidos grasos saturados de 6, 8 y 10 átomos de carbono, que inhiben el transporte de azúcar por lo cual se tiende a adicionar en el medio de fermentación para acelerar la fermentación concentraciones entre 0,1 hasta 1 g/L de urea como fuente de nitrógeno para las levaduras (Téllez-Mora *et al.*, 2012), generando problemas de toxicidad al consumidor cuando se usan cantidades mayores de urea a las recomendadas por especificación o por contaminación con urea de los destilados por manejo no adecuado por parte del personal.

1.6.3 Usos del etanol

El etanol es utilizado en la elaboración de bebidas alcohólicas, en la industria farmacéutica y como solvente en procesos industriales (Doyle, 2005). El etanol es ampliamente usado en la industria química como un poderoso solvente y como material crudo o intermedio en la síntesis química de ésteres, compuestos orgánicos, compuestos de cadena cíclica, detergentes, limpiadores para el hogar, pinturas, barnices, cosméticos, aerosoles, perfumes, medicinas y alimentos, entre otros. Además, la mezcla de etanol con gasolina puede ser utilizada como combustible, reduciendo la contaminación medio ambiental y la generación de anhídrido carbónico en la atmósfera (Barba *et al.*, 1985; Meirelles *et al.*, 1992).

1.6.3.1 Industria alimentaria

La industria de bebidas alcohólicas durante el año 2017 produjo y comercializó 250.697 millones de litros a nivel mundial (IWSR, 2018), siendo China el principal consumidor con 10.000 millones de litros (3,98% de la producción mundial), por la elaboración del licor *baijiu* típico de ese país (licor blanco o rojo) obtenido de manera artesanal de la

fermentación del arroz en las zonas del sur y centro, siendo en el norte donde se mezcla el arroz con trigo, cebada, mijo.

Las características del licor producido dependen de la materia prima, del proceso de fabricación y de la cultura del país donde se produce. El etanol obtenido a partir de cereales como la cebada, maíz y trigo, es utilizado en la elaboración de bebidas alcohólicas como whisky escocés con una producción y comercialización de 232 millones de litros/año (0,092%), vodka con una producción de 2000 millones de litros/año (0,80%), ginebra con 119 millones de litros/año (0,047%), y cuando se obtiene a partir de caña de azúcar es utilizado para la elaboración de ron añejo o blanco sin ninguna maduración con una producción de 397 millones de litros/año (0,159%). El agave es otra materia prima utilizada para elaborar etanol, el cual es utilizado para la obtención de tequila. México es el único país donde se produce tequila en el mundo y su elaboración está alrededor de los 310 millones de litros/año (IWSR, 2018). En Nueva Zelanda, Anchor Ethanol (Fonterra Cooperative Group, Nueva Zelanda) opera tres destilerías que obtienen cerca de 19 millones de litros de etanol al año a partir de lactosuero (Thiele, 2005; Ling, 2008), mientras que en Irlanda, la empresa Carbery produce cerca de 11 mil toneladas de etanol por año (Doyle, 2005). En la Figura 10 se presentan diferentes bebidas alcohólicas elaboradas a partir de suero de quesería.

El Bailys, licor de crema irlandesa desarrollado por la destilería Carbery y elaborado a partir de crema y whisky irlandés (receta original), ha sido modificado por la casa Carbery y utiliza actualmente etanol obtenido del suero de quesería (Rushe, 2016). *Ballyvolane Guest House* lanzó al mercado el producto “Ginebra a base de leche irlandesa, la venganza de Bertha”, la cual es elaborada a partir de etanol obtenido de suero de quesería de la fabricación de sus propios quesos. Para la obtención de este producto se realiza una doble destilación hasta alcanzar 96% de alcohol, procediéndose a adicionar las especies como enebro y semillas de cilantro, se diluye con agua de manantial (relación 1:1) hasta el contenido de alcohol deseado, su producción es de 3200 L mensuales (Rusche, 2016). En Reino Unido se comercializa un vodka marca *Black Cow*, elaborado a partir de suero de quesería obtenido de la fabricación de quesos de un granjero local. Una vez fermentado el suero es destilado 3 veces hasta alcanzar un 70% de alcohol.



Figura 10. Bebidas alcohólicas elaboradas con etanol obtenido a partir de suero de quesería.

Fuente: Rushe (2016).

1.6.3.2 Industria cosmética

Los perfumes, colonias y fragancias son una mezcla de aceites esenciales y esencias aromáticas de origen vegetal, animal o sintético diluidos en etanol, agua, así como otros productos químicos que sirven como fijadores, estabilizantes del perfume y potenciadores de las mezclas (Figura 11). Se utiliza etanol al 96 °Gay Lussac, el cual debe ser desodorizado por medio de un proceso de oxidación con la finalidad de quitar cualquier olor que tenga antes de ser usado como solvente y corresponde al ingrediente en mayor proporción en los perfumes (> 75%). Se usa durante la fabricación para diluir la esencia o aceite esencial, durante su uso, al entrar en contacto con la piel, el calor del cuerpo evapora el etanol, dejando impregnada las sustancias aromáticas (Torres, 2004).

Los fijadores naturales son generalmente aceites que tienen altos puntos de ebullición (285 a 290 °C), y los sintéticos son ésteres inodoros y de alto punto de ebullición (295 °C) como el diacetato de glicerilo y ftalato de etilo. Su función es principalmente que el perfume tarde mucho más tiempo en volatizarse y por lo tanto resulten más duraderos.

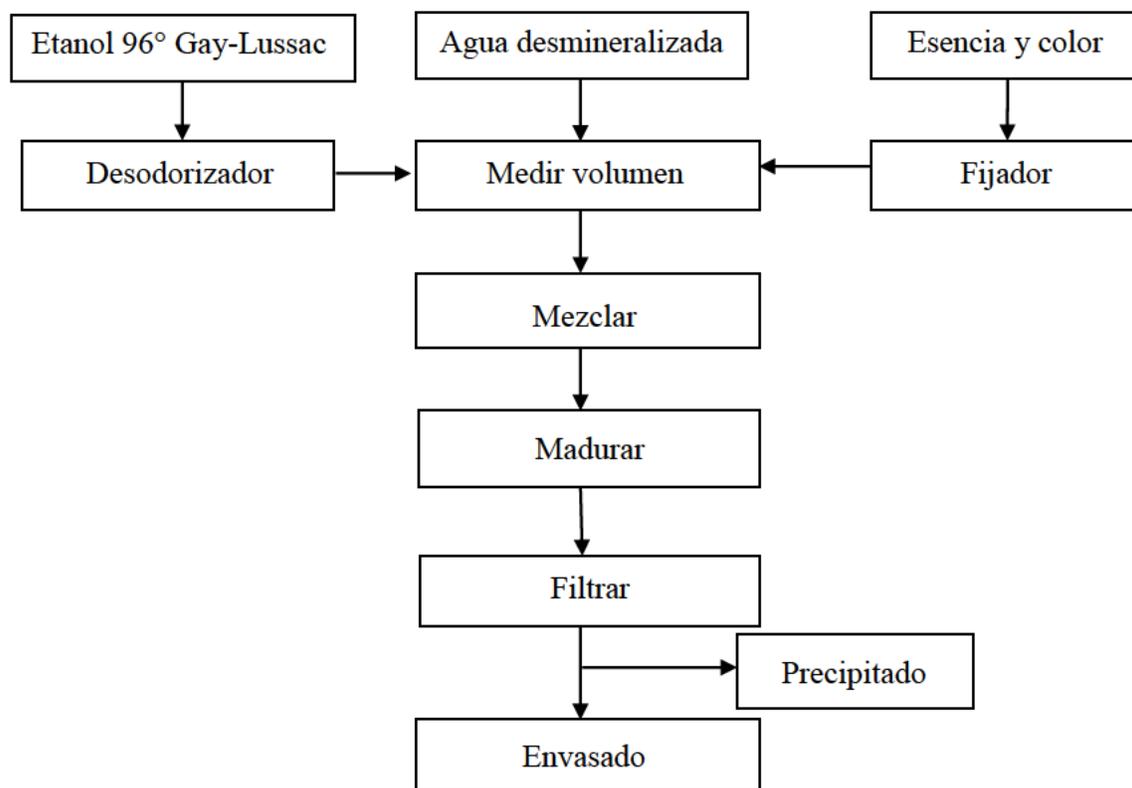


Figura 11. Esquema para la elaboración de perfumes a partir de etanol.

Fuente: Torres (2004).

1.6.3.3 Industria farmacéutica

El etanol es ampliamente utilizado como solvente en los siguientes procesos de la industria farmacéutica: (1) elaboración de sustancias químicas; (2) fermentaciones; y (3) procesos de extracción a partir de tejidos vegetales y animales.

Estas técnicas son realizadas con la finalidad de obtener principios activos, los cuales son utilizados en la elaboración de diferentes tipos de medicamentos entre ellos productos liofilizados, antibióticos, pomadas y ungüentos (Figura 12).

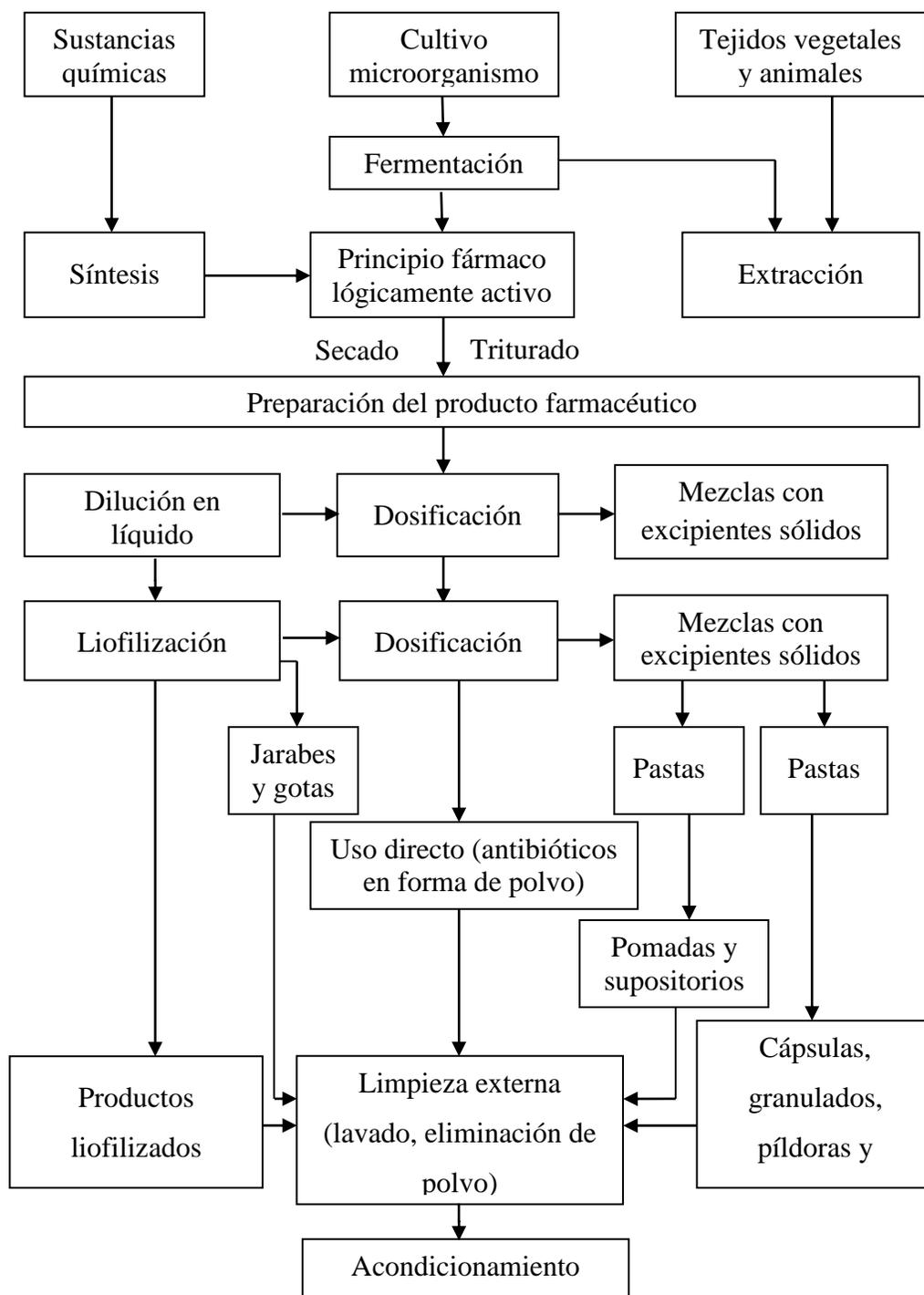


Figura 12. Procesos de fabricación en la industria farmacéutica.

Fuente: Tait (1995).

El etanol es utilizado como ingrediente en medicamentos como jarabes, ungüentos y cremas al favorecer la conservación del producto y en otros casos, permite disolver algunos

ingredientes activos que tienen baja solubilidad en agua (Tait, 1995). En las revisiones realizadas no se han conseguido registros que se utilice etanol de suero en la industria farmacéutica.

1.6.3.4 Industria energética como biocombustible

Según la materia prima de donde se obtiene el biocombustible, puede clasificarse en bioetanol y biodiesel, siendo el bioetanol obtenido a partir de biomasa, ya sea para propósitos de transporte, generación eléctrica o calefacción, y se produce a partir de cultivos tales como caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L), remolacha (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *Altissima*), trigo (*Triticum aestivum*) y sorgo (*Sorghum*; Moench). El biodiesel se produce a partir de oleaginosas como raps, girasol (*Helianthus annuus*), soja (*Glycine max*) o árboles de palma (*Elaeis guineensis*).

El bioetanol es un destilado líquido de etanol producido de la fermentación de plantas ricas con alto contenido de azúcar y de cereales, que se utiliza en el proceso de producción para obtener éter etil terbutílico (EBTE) resultante de la mezcla de 47% de etanol con 53% de isobutileno y su esquema de fabricación se presenta en la Figura 13.

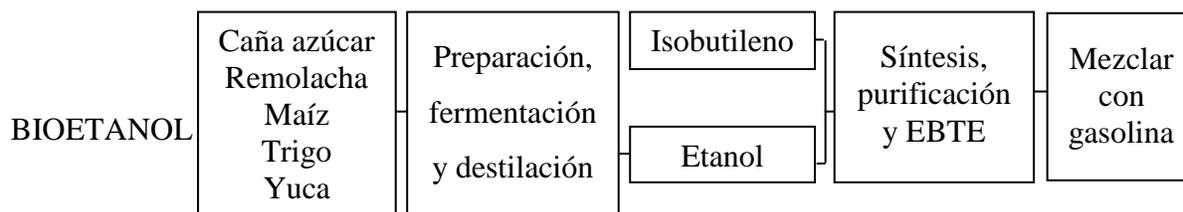


Figura 13. Esquema de producción de bioetanol en la obtención de biocombustible.
Fuente: COM (2013).

Estados Unidos y Brasil dominan el mercado mundial de bioetanol y el consumo de combustibles renovables (RFS2). Estados Unidos ha marcado un crecimiento de los biocombustibles (obtenidos de maíz principalmente) en la última década (2000 a 2010) y lo está haciendo igualmente en la década presente donde se espera alcanzar una producción de 61600 millones de litros en el 2020, al igual que el aumento del parque de vehículos flex fuel en Brasil (obtenido de caña de azúcar), siendo la principal causa de la fabricación de etanol en estos países (OCDE/FAO, 2017). La producción mundial de bioetanol ha crecido

desde 16.600 millones de litros en el 2001 a 128.000 millones de litros en el 2019 (OCDE/FAO, 2017) (Figura 14). La Unión Europea (UE) es el cuarto gran productor y consumidor de biocombustibles (25% de etanol y 75% biodiesel) para uso en mezclas de gasolinas E5 compuesta de 5% bioetanol y 95% gasolina. La producción de bioetanol registró un incremento de 1803 millones de litros en el 2006 a 7300 millones de litros en el 2020, utilizando maíz y trigo principalmente (OCDE/FAO, 2017).

En el 2011 entró en vigor la directiva de energías renovables de la UE 2009/28/CE (DER) también conocida como directiva 20/20/20, la cual recoge los siguientes objetivos: (1) reducción del 20% de las emisiones de gases de efecto invernadero para el 2020 con respecto a 1990; (2) mejorar el 20% de la eficiencia con respecto a las previsiones para el 2020; y (3) establecer una cuota de 20% de energías renovables en el cómputo total de energías de la UE, con el objetivo mínimo de que el 10% de esta cuota de consumo de energía, se aplique al transporte de cada estado miembro de la UE.

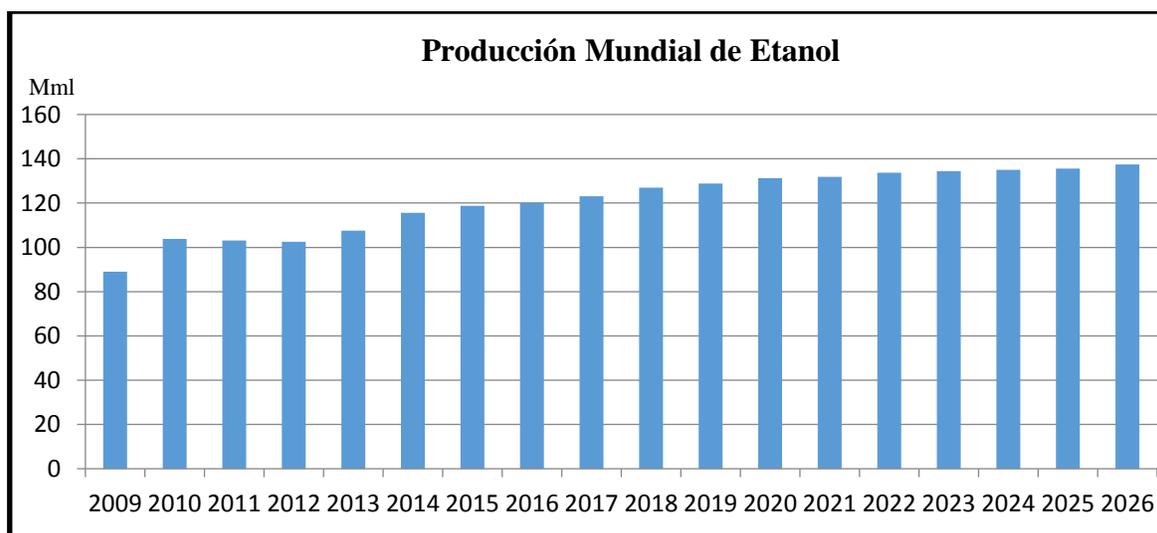


Figura 14. Desarrollo del mercado mundial de bioetanol.

Fuente: OCDE/FAO (2017), “OCDE-FAO” Perspectivas Agrícolas”, Estadísticas de la OCDE sobre agricultura (base de datos).

La capacidad de producción de biocombustibles en las instalaciones en la UE para el año 2020 ascenderán a 7300 millones de litros en 67 plantas distribuidas en todos los estados de la UE. España cuenta con 5 plantas y produce 559 millones de litros/año de bioetanol,

donde 3 plantas utilizan cereales (maíz y trigo) como materia prima, la cuarta planta utiliza alcohol etílico obtenido de los residuos de la industria del vino y cítricos, y una quinta planta que produce bioetanol de segunda generación-lignocelulósico, a partir de paja de trigo y cebada (OCDE/FAO, 2017).

En cuanto al bioetanol producido a partir de suero de quesería, Ling (2008) indicó que la cantidad mínima de producción debe ser 60.000 L para que la operación sea económicamente rentable utilizando el proceso Carbery. Anchor Ethanol Ltd. en Nueva Zelanda produce 17 millones de litros de etanol por año a partir de suero de quesería y utilizando una parte de la producción como biocombustible (Thiele, 2005). El bioetanol producido por Anchor es vendido a compañías petroleras de Nueva Zelanda para producir una mezcla E10 de gasolina y etanol (Ling, 2008). En los Estados Unidos, Dairy Farmers of América (DFA) operó en California la planta Corona que es una subsidiaria de la planta Golden Cheese y utilizó el proceso Carbery para la producción de etanol de permeado de suero de quesería con una producción de 5 millones de galones por año, esta planta cerró y dejó de producir etanol de suero de quesería el 31 de Diciembre del 2007 por los altos costos de destilación al utilizar suero no concentrados de quesería. En Melrose, Minesota (EE. UU.) opera la planta Land O'Lakes que pertenece a Land O'Lakes y DFA con una capacidad de 3 millones de galones al año de etanol obtenido de permeado de suero de quesería. Esta planta utiliza cepas de levadura propias y la tecnología fue desarrollada por Kraft donde el permeado de suero de quesería es concentrado antes de la fermentación, reduciendo el costo al momento de la destilación. El alcohol de suero es utilizado en la producción de biocombustibles y en la industria de bebidas (Ling, 2008).

EL biodiesel o aceite vegetal metil éster (VOME, por sus siglas en inglés) se produce de la reacción de aceite vegetal con etanol o bioetanol con un catalizador para producir alquil-éster y glicerina, las cuales luego son extraídas. El aceite utilizado es producido a partir de oleaginosas o árboles tales como palma africana, cocotero, girasol, jatrofa o soja. También se puede producir a partir de grasas animales, sebo y aceite para cocinar ya usado. El proceso de producción se detalla en la Figura 15.

A nivel mundial se espera para el 2020 una producción de 40.000 millones de litros de biodiesel y que la Unión Europea permanezca como el productor más importante con una producción de 14.300 millones de litros (OCDE/FAO, 2017).

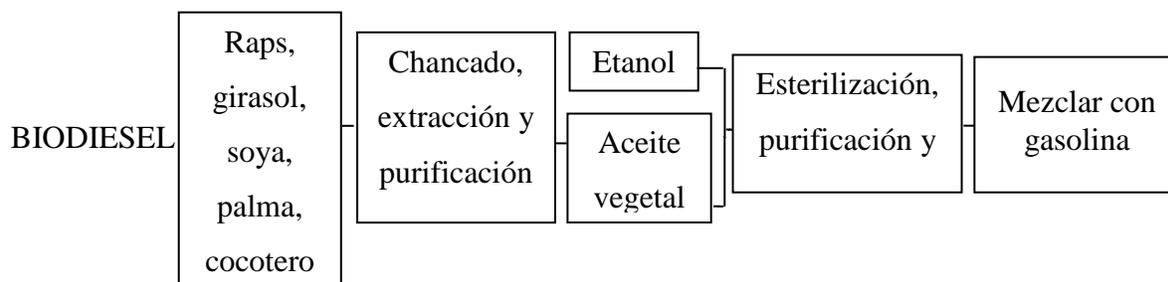


Figura 15. Esquema de producción de biodiesel a partir de etanol.

Fuente: COM (2013).

La revisión de las bases teóricas y antecedentes sobre metodologías relacionadas con el uso de lactosuero para la producción de etanol constituyeron los fundamentos para la realización de la presente tesis doctoral.

Capítulo II

Antecedentes, objetivos y plan de trabajo

2.1 ANTECEDENTES

El suero de quesería es el mayor subproducto producido en la industria láctea y está compuesto aproximadamente de 93% de agua, 5% de lactosa, 0,7-1,0% de proteína, 0,3% de grasa, 0,2% de ácido láctico y sales minerales (González Siso, 1996; Silveira *et al.*, 2005). En la producción de 1 kg de queso, se producen aproximadamente 10 kg de suero (Carvalho, 2013) y en el caso de los quesos elaborados por Pasteurizadora Táchira C.A se generan en promedio 9 L de suero por cada kilogramo de queso. Aproximadamente el 50% de los sueros producidos a nivel mundial son vertidos al drenaje, por lo costoso del equipamiento para la producción de subproductos como suero en polvo, ingredientes ó simplemente su depuración en plantas de tratamiento, causando un alto daño medio ambiental a los cuerpos de agua, principalmente debido a la alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) que oscila entre 30 y 50 g/L (Guimarães *et al.*, 2010).

En décadas recientes la producción de etanol ha sido utilizada en la elaboración de bebidas alcohólicas en la industria de alimentos, como antiséptico e ingrediente en la industria farmacéutica, como solvente en la industria química y biocombustible por la industria petrolera, provocando un incremento en la demanda (Rana, 2013).

Pasteurizadora Táchira C.A. es una empresa dedicada a la producción de productos lácteos en Venezuela, y en base al volumen de leche procesado es la mayor quesera industrial del país. Dentro de los productos que fabrica encontramos leches pasteurizadas, quesos frescos, hilados, semimadurados, madurados, fundidos, requesón, postres lácteos como el dulce de leche y chocolates de leche. Los permeados de suero de quesería dulce de queso Blanco fresco, dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco, y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella son los subproductos con más volumen producidos actualmente por la empresa. Una de las preocupaciones principales de Pasteurizadora Táchira C.A. es el uso del permeado desnatado y desproteínizado de suero de quesería para la obtención de productos con alto valor agregado.

El presente trabajo se enfoca en la elaboración de un medio de fermentación, a partir de permeados de suero de quesería que cumpla con los criterios relacionados con el incremento en la concentración de azúcares reductores, reúna los requerimientos nutricionales y de pH de las levaduras, permitiendo una mayor producción de etanol

alimentario al momento de realizar la fermentación, así mismo evaluar el efecto que tiene la presencia de sal (NaCl) sobre las levaduras y la producción de etanol, la calidad del etanol producido y su aptitud para consumo humano. El enfoque del proyecto es netamente económico y ambiental, buscando cumplir con el principio del aprovechamiento, al dar valor agregado a subproductos que pueden convertirse en residuos por falta de inversión en investigación y desarrollo.

2.2 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido evaluar el uso de permeados concentrados de suero de quesería procedentes de la empresa Pasteurizadora Táchira C.A. como medio de fermentación para la producción de etanol alimentario. Para cumplir el objetivo general propuesto, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los sueros y permeados de suero dulce de queso Blanco fresco, dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella producidos por la empresa Pasteurizadora Táchira C.A.
2. Elaborar un medio de fermentación a partir de la mezcla en diferentes proporciones de permeados de suero de quesería producidos por Pasteurizadora Táchira C.A. que reúnan unas condiciones óptimas para el crecimiento y producción de etanol por parte de las levaduras seleccionadas.
3. Evaluar la capacidad de producción de etanol de diferentes especies de levaduras seleccionadas en el medio de fermentación obtenido a partir de los permeados de suero de quesería concentrados.
4. Determinar el efecto de la presencia de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación relacionado a la producción de etanol, utilizando las diferentes especies de levaduras seleccionadas.
5. Determinar por cromatografía de gases la calidad de los destilados ricos en etanol obtenidos a partir del medio de fermentación procedente de permeados concentrados de sueros de quesería.

2.3 PLAN DE TRABAJO

Para la realización de esta tesis doctoral se plantearon 5 estudios diferentes, lo cuales se detallan a continuación.

Estudio 1: Se determinó la composición promedio de los sueros de quesería producidos por Pasteurizadora Táchira C.A., y se realizó la caracterización de cada uno de los permeados de suero dulce de queso Blanco fresco, dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella. El tamaño de cada una de las muestras fue de 40 L y se tomaron directamente de los tanques de almacenamiento de permeados de suero con una frecuencia de 7 días durante 9 semanas, para un total de muestras de 9 lotes muestreados ($n = 9$). Las variables de estudio seleccionadas para establecer las especificaciones fisicoquímicas de cada uno de los permeados fueron: proteína, azúcares reductores, cloruro de sodio y pH (Figura 16).

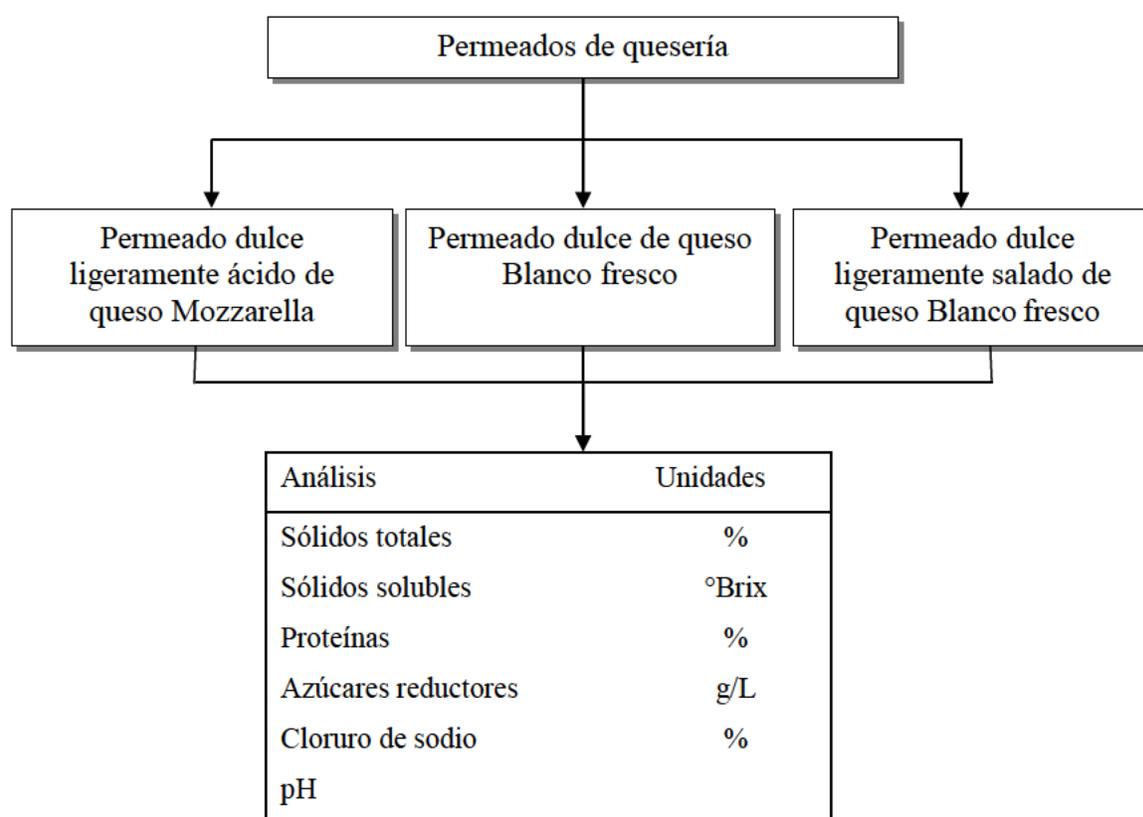


Figura 16. Caracterización fisicoquímica de sueros de quesería producidos por Pasteurizadora Táchira C.A.

Estudio 2: El segundo estudio se basó en la producción y caracterización de diferentes concentrados de permeados de suero obtenidos a partir de mezclas de sueros dulces ligeramente ácidos de queso Mozzarella, sueros dulces de queso Blanco y sueros dulces ligeramente salados de queso Blanco fresco, los cuales fueron mezclados en diferentes proporciones para obtener mezclas de permeados sin y con presencia de NaCl (1 y 2%). En la Figura 17 se muestra el diagrama de flujo para la producción del medio de fermentación base a partir de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y suero dulce de queso Blanco fresco.

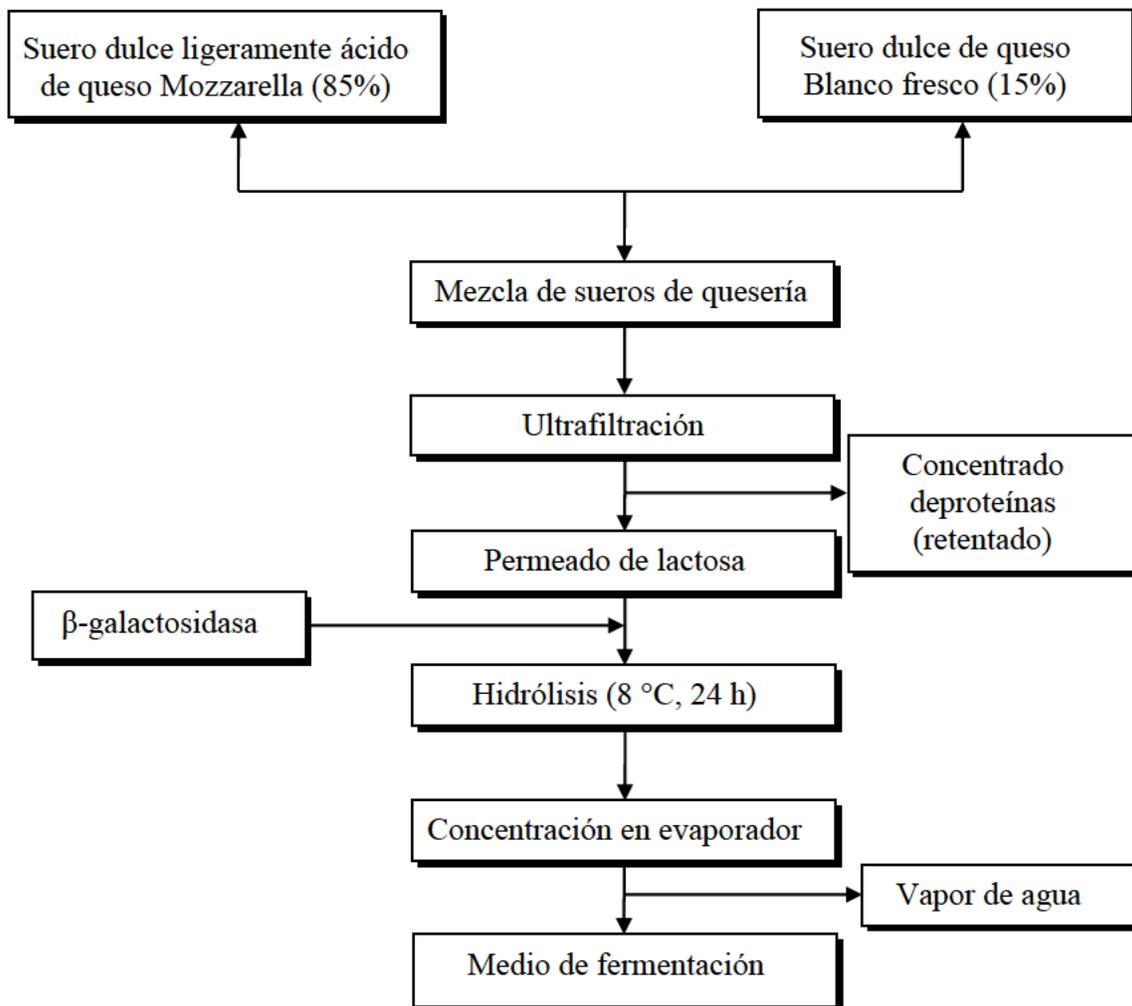


Figura 17. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del medio de fermentación.

Las mezclas de permeados fueron ultrafiltradas logrando un permeado con 67% menos de proteína, descartando el retentado concentrado de proteínas y reservando el permeado de la mezcla de suero, el cual fue adicionado de la enzima β -galactosidasa para hidrolizar la lactosa, hasta alcanzar valores superiores al 70% de hidrólisis. La mezcla de permeado ultrafiltrado e hidrolizado fue concentrada en un evaporador hasta alcanzar un pH entre 4,5 y 5,0, pH óptimo para el desarrollo de las levaduras y una concentración de azúcares reductores >30%.

Como se describirá en la sección 4.1.3. de Medio de Fermentación, una vez obtenidos los medios de fermentación, se pudo advertir que aquellos que contenían NaCl presentaron en las preparaciones sucesivas variaciones oscilantes en la concentración final de NaCl en el medio de fermentación, por lo que se procedió a realizar los ajustes de NaCl a 1 y 2% de NaCl por adición directa de NaCl comercial a la mezcla de los permeados concentrados procedentes de los sueros que se producen con más abundancia en la empresa Pasteurizadora Táchira, que son el suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y el suero dulce de queso Blanco fresco en proporciones 85:15.

Estudio 3: Se realizó un estudio preliminar donde se evaluó la capacidad fermentativa y productora de etanol de las levaduras *Saccharomyces bayanus* marca comercial Fermiline® Tipicity, *Saccharomyces cerevisiae* marca comercial Levepan® y *Kluyveromyces marxianus* ATCC® 36142™, aplicándose los criterios de selección de disminución del porcentaje de azúcares reductores, y de producción de etanol durante la fermentación (Figura 18). El experimento solo se realizó en una ocasión pero se utilizaron duplicados de cada una de las fermentaciones realizadas. En base a los resultados obtenidos sobre la utilización de azúcares reductores y productividad de etanol, se seleccionaron las levaduras *Saccharomyces bayanus* marca comercial Fermiline Tipicity® y *Saccharomyces cerevisiae* marca comercial Levepan®, que fueron utilizadas en pruebas de repetibilidad de producción de etanol en concentrados de permeados ultrafiltrados, hidrolizados con la enzima β -galactosidasa, concentrados en evaporador y adicionados o no de 1 y 2% de NaCl.

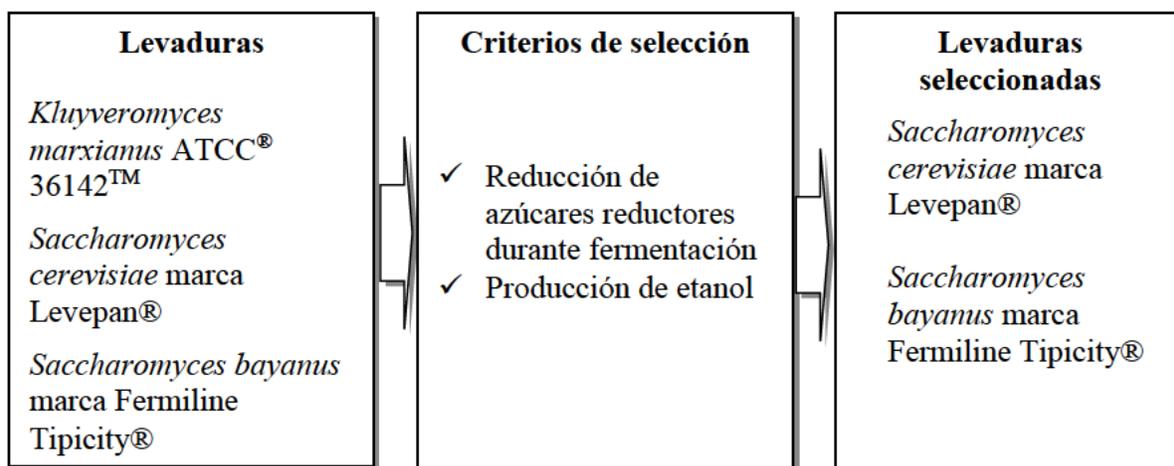


Figura 18. Levaduras y criterios de selección utilizados para la selección de las levaduras utilizadas en la producción de etanol a partir de permeados concentrados procedentes de suero de quesería.

Estudio 4: En este estudio se realizaron pruebas de fermentación donde se evaluaron las 2 levaduras seleccionadas (*Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity® y *Saccharomyces cerevisiae* marca Levepan®) en medios de fermentación con concentraciones de 0, 1 y 2% de NaCl (Figura 19).

Las pruebas de fermentación fueron realizadas en tres ocasiones independientes utilizándose duplicados a una temperatura de 32 ± 1 °C, sin agitación y en condiciones anaeróbicas. El tiempo total de fermentación fue de 5 días con una frecuencia de análisis cada 24 h, donde se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Una alícuota de los medios fermentados se sometieron a destilación en columna fraccionada y los destilados obtenidos fueron analizados por cromatografía de gases con la finalidad de conocer la concentración de etanol y su calidad a través de la presencia de metanol, sustancia perjudicial para la salud humana.

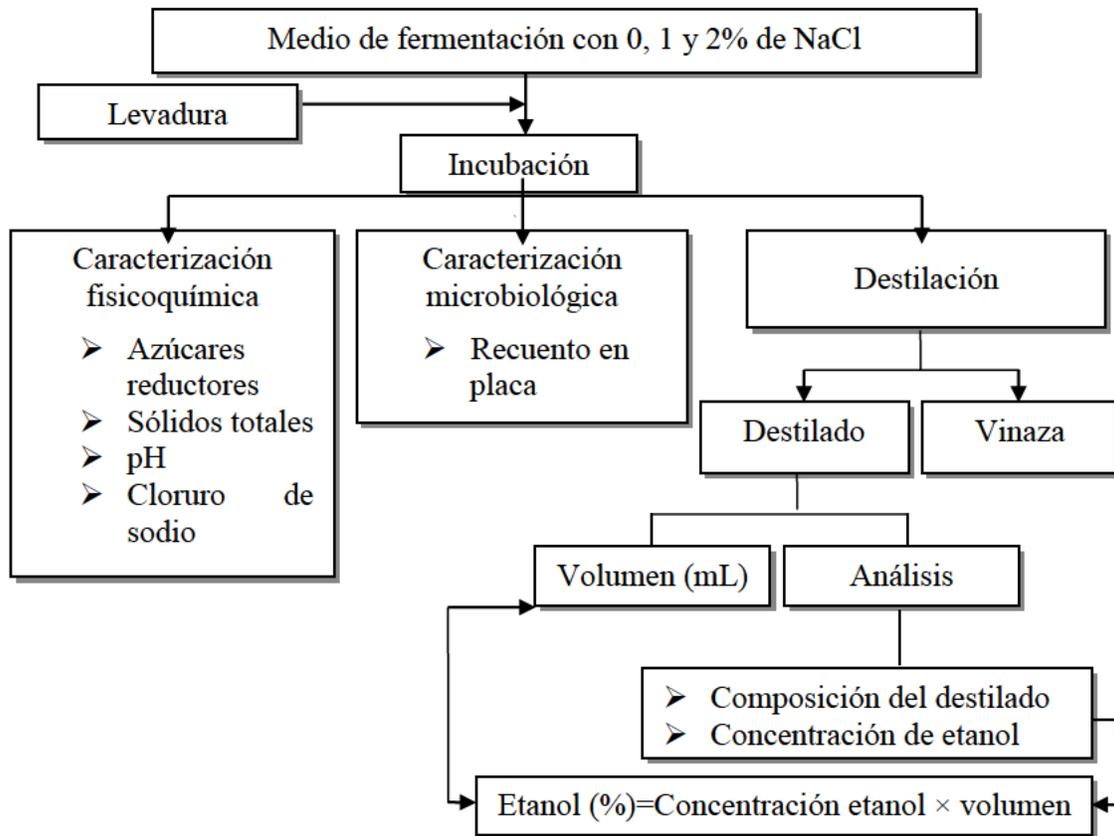


Figura 19. Esquema de producción de etanol con análisis realizados durante la fermentación.

Capítulo III

Materiales y métodos

3.1. OBTENCIÓN DE SUEROS Y PERMEADOS EN PASTEURIZADORA TÁCHIRA

En las instalaciones de la Pasteurizadora Táchira se producen tres tipos de sueros: (1) dulce de queso Blanco fresco marca Paisa; (2) dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco marca Paisa; y (3) dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella marca Paisa, así como sus correspondientes permeados según se detalla a continuación.

3.1.1 Suero y permeado de suero dulce de queso Blanco fresco

El queso Blanco fresco marca Paisa es elaborado en Pasteurizadora Táchira a partir de leche estandarizada de vaca a $3,20 \pm 0,50\%$ de grasa y $3,15 \pm 0,16\%$ de proteína, a la cual se aplica un tratamiento de pasteurización tipo HTST de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s, seguido de un enfriamiento de la leche ($34\text{ }^{\circ}\text{C}$) a la salida del pasteurizador para después depositarse en la tina de fabricación. Una vez en cuba de fabricación (12.500 L leche) con una temperatura de $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ se adiciona un sobre de cultivo láctico mesófilo liofilizado (cultivo MA 011, 50 DCU, DuPont™, Danisco®, Rochester, EE. UU.), 2,50 kg de CaCl_2 (94%, pureza) (ALCALI®, Industrias del ALCALI, S.A, Ciudad García, Nuevo León, México) previamente diluido en agua, seguido de la adición de 213 g de quimosina (previamente diluida en 5 L de agua) con una actividad de 1175 unidades internacionales de coagulación de leche (IMCU) (Chymax®, Chr.Hansen, Hoersholm, Dinamarca). Después de una agitación por 2 min, la coagulación se produce en reposo en 45 min para obtener un coágulo firme. Luego se realiza el corte de la cuajada por 10 min para obtener un grano de tamaño de garbanzo, seguido de un reposo por 5 min y agitación por 5 min, calentamiento a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$, y de nuevo agitación por 10 min hasta obtener un grano cocido y con la humedad requerida. La mitad del suero se drena y es enviado a un silo de almacenamiento de sueros, donde se conserva a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso en la fabricación de requesón, y la otra parte del suero queda en el tanque de coagulación con la cuajada. Una vez drenada la cuajada en la moldeadora de queso, el suero es separado y enviado a través de bomba centrífuga a los tanques de almacenamiento de sueros.

El proceso de fabricación de requesón se inicia con el calentamiento del suero en un intercambiador de calor a una temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, y adicionando 0,2% de tri-sodio citrato dihidratado (99% pureza) (TTCA Co., Ltd, Angiu, Shandong, China) para neutralizar la acidez de suero y estabilizar las proteínas. El proceso de fabricación prosigue con el

calentamiento utilizando vapor de agua hasta alcanzar una temperatura de 93 °C, procediendo a la adición de 0,0625% de CaCl₂ (Álcali, Industrias Álcali, Nuevo León, México) para precipitar las proteínas al formar agregados de sólidos de suero, y se deja en reposo por 15 min procediéndose a la descarga del suero a través de un cilindro metálico perforado que permite separar los sólidos de suero (futuro requesón después de su moldeado) del permeado de suero que corresponde a una parte de la materia prima de la presente investigación.

3.1.2 Suero y permeado de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco

El protocolo de fabricación de este queso es similar al descrito en el apartado 3.1.1. En este queso el salado de la cuajada, que queda en tanque una vez terminado el calentamiento a 39 °C bajo agitación para alcanzar textura y desuerado de la mitad del suero dulce, se realiza directamente en la cuba de quesería mediante la adición de una salmuera al 23% NaCl (Bahía, Araya, Venezuela) quedando aproximadamente 4500 L de suero dulce ligeramente salado con 3,33% de NaCl (Bahía, Araya, Venezuela) cuando se parte de una cantidad de leche en cuba de 12.500 L. Una vez separado de la cuajada, el suero es enviado al silo de almacenamiento donde se conserva a una temperatura de 4 °C hasta su uso. El suero salado es utilizado en la fabricación de aderezos salados (suero Táchira), requesones untables (Ricotta Paisa), cremas de suero (Nata de Aquí) y en una menor proporción para elaborar sólidos de suero. Actualmente la cantidad de suero salado generado de queso Blanco es muy baja, siendo consumida casi en su totalidad en los productos antes mencionados.

En la fabricación de requesón a partir de sueros dulces ligeramente salados, esta se inicia con el calentamiento de 8000 L de suero en intercambiador de calor a una temperatura de 65 °C, seguido de la adición de 16 kg de tri-sodio citrato dihidratado (TTCA Co.) para neutralizar la acidez del suero y estabilizar las proteínas, seguido del calentamiento utilizando vapor directo hasta alcanzar una temperatura de 93 °C, procediendo después a la adición 8 kg de ácido cítrico anhidro (TTCA Co.) para desnaturalizar las proteínas y hacerlas que precipiten formando los sólidos de suero. Finalmente se deja en reposo por 15 min y se procede a la descarga del suero a través de un cilindro metálico perforado que nos permite separar el requesón del permeado de suero ligeramente salado que corresponde a una parte de la materia prima de la presente investigación.

3.1.3 Suero y permeado de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella

En Pasteurizadora Táchira el queso Mozzarella es elaborado a partir de leche de vaca, estandarizada al $3,00 \pm 0,05\%$ de grasa y proteína $3,15 \pm 0,16\%$, a la cual se aplica un tratamiento de pasteurización tipo HTST de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s, seguido de un enfriamiento de la leche ($19\text{ }^{\circ}\text{C}$) a la salida del pasteurizador para después depositarse en la tina de fabricación (12.500 L leche). En la cuba se adiciona 1,12% de ácido cítrico anhidro 99,5% (TTCA Co.), por litro de leche (solución al 35% de ácido cítrico en agua) con la finalidad de acidificar la leche hasta un pH entre 5,80 y 5,90, favoreciendo la solubilización del calcio y su posterior hilado (Kindstet, 1992). A continuación, se procede a calentar la leche hasta $34\text{ }^{\circ}\text{C}$, se adiciona un cultivo iniciador de *Streptococcus thermophilus* (STI-4, Chr. Hansen), y CaCl_2 (Álcali, Industrias Álcali) al 0,0192%, para finalmente añadir la solución preparada con 213 g de quimosina de 1175 IMCU (Chymax®, Chr. Hansen) diluida en 5 L de agua. Después de agitar 2 min, se deja en reposo 30 min para el proceso de coagulación, se realiza el corte de gel por 10 min hasta tamaño de grano de garbanzo, se agita por 5 min hasta alcanzar una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, para después proceder de nuevo a una agitación de los granos de cuajada con el suero por 60 min hasta obtener un grano cocido y con la humedad requerida. La cuajada se descarga en la hiladora con la finalidad de realizar el amasado, hilado y salado en salmuera ($23\text{ }^{\circ}\text{Baume}$), moldeado, y volteado con la finalidad de favorecer el desuerado y compactación, se traslada a la cámara de refrigeración por 24 h y se procede al empacado al vacío.

El suero obtenido de la fabricación de queso Mozzarella, es enviado al silo de almacenamiento, donde se conserva a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso en la elaboración de requesón, proceso que se inicia con el calentamiento del suero en intercambiador de calor a una temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, adición de 0,2% de tri-sodio citrato dihidratado al 99% (TTCA Co.) para neutralizar y estabilizar las proteínas, y se continua con un calentamiento utilizando vapor hasta alcanzar una temperatura de $93\text{ }^{\circ}\text{C}$, procediendo a la adición de 0,1% ácido cítrico anhidro al 99,5% (TTCA Co.) para desnaturalizar las proteínas y hacerlas que precipiten formando los sólidos de suero, dejándose en reposo 15 min y posteriormente procediéndose a la descarga del suero a través de un cilindro metálico microperforado que permite separar los sólidos de suero, del permeado que también formo parte de nuestra materia prima en la presente investigación.

3.2. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE SUEROS Y PERMEADOS DE PASTEURIZADORA TÁCHIRA

La toma de muestras se realizó a partir de los sueros y permeados procedentes de la elaboración de queso Blanco fresco marca Paisa en sus variedades con y sin sal, y de la elaboración de queso Mozzarella marca Paisa y fueron proporcionados por la empresa Pasteurizadora Táchira C.A, ubicada en la ciudad de San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela. Los sueros y permeados procedieron de procesos de 12.500 L de leche que corresponde a la cantidad estándar que se usa por proceso durante la fabricación de estos quesos, y las muestras de los diferentes sueros se obtuvieron directamente de los tanques de floculación (8000 L, Bertona, San Cristóbal, Venezuela) dotados de agitación e inyección de vapor, previa a la fabricación de requesón. Al momento de las tomas de muestras, el tanque tenía un contenido de 8000 L de suero con agitación a 16 rpm, y la muestra se recolectó en la tubería de descarga en cantidad de 40 L por lote y tipo de suero en una cántara con capacidad de 40 L (Trifolet, Trifolet, Dinamarca). De la cántara, previa agitación, se tomó una muestra utilizando un vaso de acero inoxidable (Envases Venezolanos, Maracay, Venezuela) con capacidad de 150 mL, la cual fue llevada al laboratorio para realizar los análisis físicoquímicos de proteína, lactosa, cloruros y pH, análisis que se realizaron mínimo por duplicado para cada uno de los sueros y permeados antes descritos. Todas las muestras fueron conservadas a una temperatura de 4 °C por 24 h antes de su análisis.

Después de realizar el proceso termoácido de floculación para la obtención del requesón (ver puntos 3.1.1, 3.1.2 y 3.1.3), los permeados de suero dulce de queso Blanco, dulce ligeramente salado de queso Blanco y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella fueron recolectados en la tubería de descarga de permeados al drenaje durante el moldeo del requesón en una cantidad de 40 L por lote y tipo de permeado. Una vez obtenidas las muestras en cántaras de 40 L, previa agitación y utilizando un vaso de acero inoxidable de 150 mL, se tomó una muestra la cual fue llevada al laboratorio para realizar los análisis físicoquímicos de proteína, lactosa, cloruros y pH, mínimo por duplicado de cada uno de los permeados antes descritos. Todas las muestras fueron conservadas a una temperatura de 4 °C máximo por 24 h antes de su análisis. La frecuencia de toma de muestra de los sueros

y permeados fue cada semana durante 9 semanas para un total de 9 lotes muestreados (n = 9) por cada uno de los sueros y permeados a caracterizar.

3.3. MEDIO DE FERMENTACIÓN

En la elaboración del medio de fermentación se siguieron una serie de pasos con la finalidad de obtener un producto que cumpla con unas condiciones de pH iniciales entre 4,0 a 5,0 para favorecer el crecimiento celular (Fohl-Mallol *et al* 2004; Fajardo & Sarmiento, 2007; Dinitz *et al*, 2014) y una concentración de azúcares fermentables entre 4 a 30% sin producir inhibición por sustrato (Fohl-Mallol *et al*, 2004; Zafar, 2005; Dinitz *et al*, 2014; Dolmar, 2018) en donde a una mayor concentración de sustrato en el medio de fermentación, se obtendrá una mayor concentración de etanol durante la fermentación por parte de las levaduras utilizadas, haciendo la operación económicamente rentable.

3.3.1 Proceso de ultrafiltración

Con la finalidad de reducir la cantidad de proteína residual presente en los permeados de suero se utilizó un equipo de ultrafiltración marca GEA-NIRO de 100 L de capacidad para pruebas de laboratorio (GEA-NIRO 150L, Wisconsin, EE. UU.), con membrana PTI Advanced Filtration SD3838-0S03-S de fluoruro de polivinilideno con tamaño de poro 0,1 µm (PTI Technologies Inc, Oxnard, EE. UU.). La mezcla fue calentada a una temperatura de 50 °C y adicionada a través del tanque de balance del equipo de ultrafiltración, recirculando el retentado a través del tanque de balance (proteínas residuales concentradas) y recogiendo en una cántara el permeado compuesto principalmente por lactosa y sales minerales, que corresponde a la materia prima para la elaboración del medio de fermentación. Las condiciones de operación durante el proceso de ultrafiltración fueron de 60 psi y se trabajó con un caudal entre 80 y 100% del caudal del trabajo de módulo de ultrafiltración, caudales que son buenos indicadores del buen funcionamiento de la membrana sugiriendo que no está colmatada por sustrato durante el proceso de filtración.

3.3.2 Hidrólisis de la lactosa

En este estudio se pretende caracterizar el medio de fermentación obtenido a partir de los permeados del suero y estudiar la actividad fermentativa de diferentes levaduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*) sobre

este medio de fermentación. De estas levaduras, *K. marxianus* es la única de las tres que es capaz de fermentar la lactosa al producir la enzima β -galactosidasa. Con respecto a las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, estas no son capaces de fermentar la lactosa debido a que no producen la enzima β -galactosidasa, que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa, que son los azúcares que pueden utilizar ambas levaduras en sus procesos metabólicos durante la fermentación. Previo al proceso de concentración, los permeados fueron añadidos de una solución enzimática con el objetivo de hidrolizar la lactosa. El producto utilizado para hidrolizar la lactosa en los permeados fue Lactozym 3000L HP-G (Novo Nordisk, Jsvaerd, Dinamarca). Esta preparación enzimática a base de β -galactosidasa obtenida de la levadura *Kluyveromyces fragilis* tiene un contenido de proteína de 35 g/L, $\rho = 1,2$ g/mL y una actividad enzimática declarada de 3000 LAU/mL (1 LAU equivale a la cantidad de enzima que puede producir 1 mol de glucosa por minuto, bajo condiciones estándar: 4,7% lactosa; pH 6,5; 30 °C y 30 min en solución de leche estándar) (Novo Nordisk). La enzima fue utilizada en una proporción de 0,25 mL/L de permeado ultrafiltrado a una temperatura de 32 °C y almacenada en refrigeración por 24 h a una temperatura de 8 °C. La adición de la enzima al permeado se realizó después del proceso de ultrafiltración con la finalidad de favorecer la actividad de la enzima por la baja concentración de sustrato presente en el medio de fermentación, evitando fenómenos de inhibición de la enzima por sustrato si se realiza en el jarabe de azúcares que se obtiene después del proceso de concentración por evaporación.

Para evaluar el porcentaje de hidrólisis de la lactosa se trabajó con un crioscopio (Advanced Instruments, Inc., M-4250, Norwood, EE. UU.) que se utilizó para determinar el punto crioscópico (punto de congelación en grados Holvert, m°H) del permeado de suero ultrafiltrado antes de la adición de la enzima β -galactosidasa (crioscopía inicial, Ci) y a las 24 h (crioscopía final, Cf).

El porcentaje de hidrólisis de lactosa se calculó utilizando la siguiente relación según Chr. Hansen (2003):

$$\text{Hidrólisis Lactosa (\%)} = (350,77 \times Cf) - \frac{Ci}{0,00285} \quad (\text{Ecuación 4})$$

3.3.3 Concentración del permeado

Una vez hidrolizada la lactosa en sus componentes monosacáridos y con el objetivo de obtener un permeado concentrado, se utilizó un evaporador discontinuo de cargas o *batch* de 183 L (TMAI, M-223, Bogotá, Colombia) en el cual se concentró el permeado ultrafiltrado hidrolizado a una temperatura de 93 °C durante 90 min, realizándose posteriormente la toma de muestra (50 mL) y análisis de sólidos solubles (°Brix) mediante refractómetro con una frecuencia de 30 min.

3.3.4 Ajuste del contenido de sal y caracterización fisicoquímica de los concentrados

Finalmente, el medio de fermentación obtenido se ajustó con dos diferentes concentraciones de sal, 1 y 2 % de NaCl (Bahía, Araya, Venezuela) con la finalidad de conocer el efecto de estrés hiperosmótico producido por las concentraciones utilizadas de NaCl en la cinética de producción de etanol de las levaduras utilizadas. Para ello se tomaron alícuotas de permeados concentrados que se llevaron a volúmenes finales de 3 L con la inclusión del NaCl correspondiente (30 y 60 g de NaCl para los permeados concentrados con 1 y 2% (m/v) de NaCl, respectivamente), obteniéndose así 3 tipos de medios de fermentación con 0, 1 y 2% de NaCl. Posteriormente se realizó análisis de NaCl a la mezcla con la finalidad de validar que la concentración de sal correspondía a la requerida según el ensayo a realizar.

Una vez obtenidos los concentrados de permeados se muestrearon, previa agitación, y se tomaron muestras por duplicado de 150 mL, que fueron llevadas al laboratorio para realizar los análisis fisicoquímicos de proteína, lactosa, cloruros y pH, mínimo por duplicado de cada uno de los permeados concentrados antes descritos. Todas las muestras fueron conservadas a una temperatura de 4 °C por 24 h antes de su análisis.

El medio de fermentación se fabricó en 9 ocasiones independientes para realizar la totalidad de los ensayos de fermentación.

En la Figura 20 se presenta el diagrama de flujo para la elaboración del medio de fermentación.

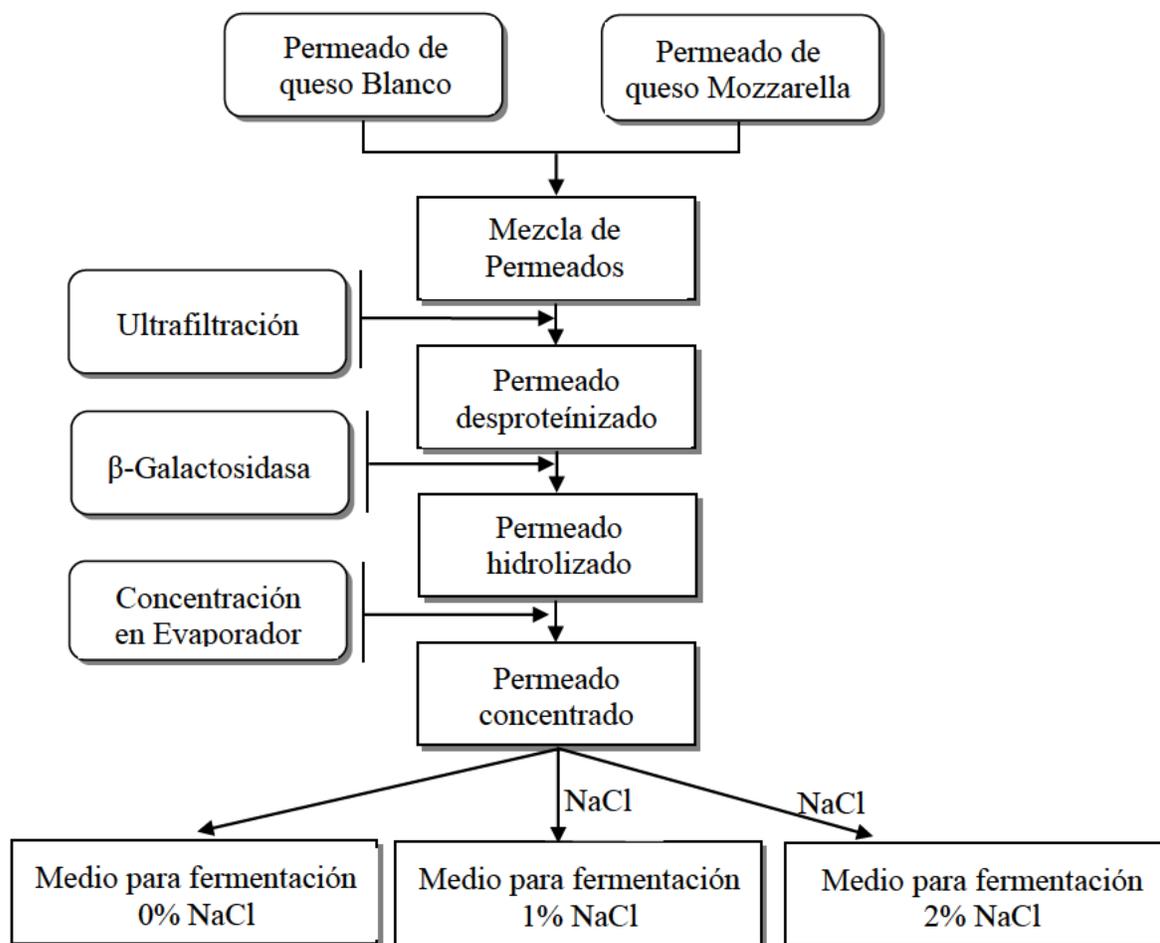


Figura 20. Etapas en la elaboración del medio de fermentación a partir de los permeados de suero de quesería.

3.4. FERMENTACIONES DE LOS CONCENTRADOS DE PERMEADO DE SUERO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

En las pruebas de fermentación se utilizaron tres levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* y *Kluyveromyces marxianus*) de diferentes orígenes, que fueron cultivadas e inoculadas en los concentrados de permeados con diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%) y contenidos en pequeños sistemas discontinuos de fermentación (contenedores de vidrio de 200 mL). El proceso de fermentación se realizó en 5 días y después se procedió a la destilación para la recuperación del etanol y valoración posterior de su calidad. El experimento completo comparativo con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus* se repitió por duplicado en 3 ocasiones ($n = 3$).

3.4.1. Levaduras

Para las pruebas de producción de alcohol se seleccionaron las levaduras indicadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Levaduras utilizadas en las pruebas de fermentación del concentrado de permeados de suero de quesería.

Levadura	Origen	Justificación de uso
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levaplan S.A. (Bogotá, Colombia)	Levadura prensada utilizada en Venezuela para la producción de pan y por productores artesanales de alcohol blanco (aguardiente). Se seleccionó por conseguirse fácilmente, por su bajo costo y uso difundido a nivel artesanal para la producción de alcohol blanco
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Fermiline Tipicity (Dolmar, España).	Levadura utilizada en la elaboración de vinos y sidras. La levadura sobrevive a concentraciones altas de alcohol (>17%), lo que proporciona vinos de mayor graduación alcohólica
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CVCM2088, ATCC 36142	Centro Venezolano de colección de microorganismos tipo (CVCM), Universidad Central de Venezuela, en Caracas, Venezuela	Es una de las levaduras más utilizadas y estudiadas para la producción de etanol a partir de suero de quesería. La levadura sintetiza la enzima β -galactosidasa, hidrolizando la lactosa y consumiendo la glucosa y galactosa durante la fermentación

3.4.2 Preparación del inóculo

En la preparación de los inóculos de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y de *K. marxianus* CVCM2088, ATCC 36142, se tomaron 0,3 g de las levaduras liofilizadas en polvo que fueron rehidratadas y diluidas individualmente en 100 mL de permeado concentrado pasteurizado (85 °C × 5 min) a una temperatura de hidratación de 25 °C durante 120 min. Una vez diluida se procedió a adicionar al total de los 2,9 L de concentrado ultrafiltrado pasteurizado (hidrolizado de permeado de suero ácido y dulce) dejando 15 min en agitación antes de transferir a las botellas de dilución que fueron utilizados como recipiente de

fermentación. Este inóculo de levaduras realizado en el medio de fermentación justo antes del inicio de la fermentación dio un recuento medio de $\sim 10^5$ UFC/mL.

En un ensayo preliminar se valoró por duplicado la productividad de etanol por parte de las 3 cepas, observándose que *K. marxianus* fue una levadura con una productividad de etanol muy baja, lejos de las obtenidas por *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, y por tanto se decidió prescindir de esta levadura en los estudios posteriores.

3.4.3 Ensayos de fermentación

Para realizar los ensayos de fermentación se utilizaron botellas de vidrio con capacidad de 200 mL, previamente esterilizadas a una temperatura de 120 °C y 20 min en autoclave (Guadagnini V80812, Maracay, Aragua, Venezuela) y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente, antes de realizar el llenado con el medio de fermentación.

Los concentrados de permeado pasteurizado de suero de quesería conteniendo concentraciones de 0, 1 y 2% (m/v) de NaCl e inoculados de las levaduras correspondientes, se vertieron en alícuotas de ~ 200 mL por botella de vidrio, procediendo al tapado con una película plástica de polietileno de baja densidad y se ajustó con tapa plástica cada una de las botellas. Las mismas fueron llevadas a estufa termoestada (Memmert, Aubere Rittersbacher Strabe, Schwabach, Alemania) a una temperatura promedio de 32 ± 1 °C. El muestreo se realizó por duplicado cada 24 h durante 5 días, obteniendo así un total de 6 puntos de muestreo para un total de 12 muestras por tipo de permeado. Estas muestras se utilizaron para realizar los análisis microbiológicos (levaduras) y fisicoquímicos (pH y azúcares reductores), con la finalidad de poder cuantificar el descenso de los azúcares reductores, crecimiento poblacional de las levaduras de interés para el cálculo de los parámetros cinéticos.

3.4.4 Destilación de los permeados fermentados

Una vez concluidos los tiempos de fermentación, se procedió a tomar 100 mL del medio fermentado por cada botella, con la finalidad de realizar la destilación.

En la Figura 21 se muestra el equipo utilizado para la destilación de los permeados fermentados que consta de un balón aforado de 500 mL acoplado a una columna de destilación fraccionada tipo Vigreux C/2 24/40 470 mm POBEL junction (Pirex®, Nueva

York, EE. UU.), termómetro de vidrio (0 a 120 °C), columna refrigerante, colector acodado, matraz de vidrio para recolectar el etanol.

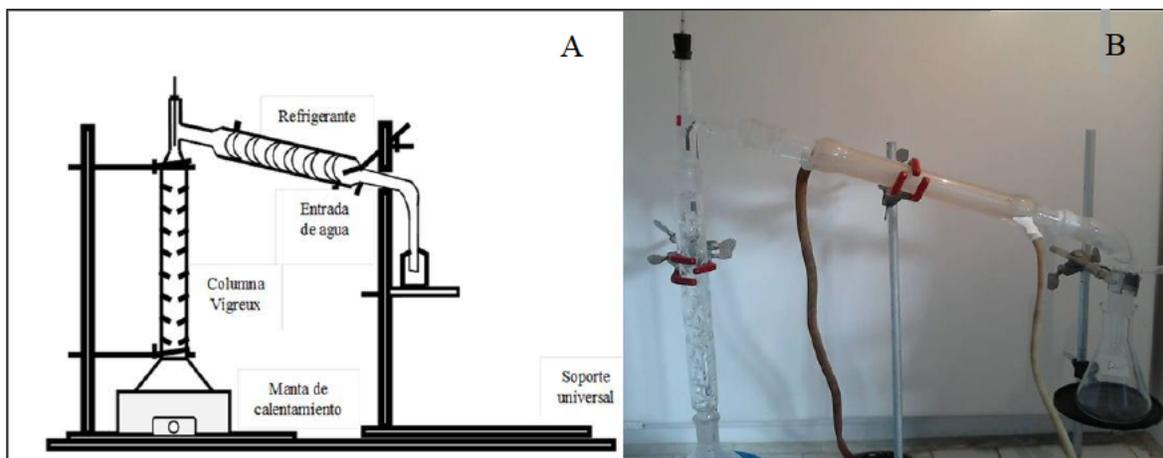


Figura 21. Esquema del equipo clásico con columna Vigreux para destilación fraccionada (A); Montaje realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la UNET (B).

Alícuotas de 100 mL del medio de fermentación descrito en el apartado 3.4.3 se utilizaron para llevar a cabo el proceso de destilación, adicionándolos en un balón aforado de 500 mL y llevándolos a ebullición con una manta de calentamiento (Cienytec, Bogotá, Colombia) para matraz balón, hasta que el termómetro de vidrio acoplado en la parte superior de la columna de destilación registró 93 °C, apagando el calentador y procediendo a recoger el destilado en matraz de erlenmeyer a la salida del condensador, midiendo el volumen de destilado obtenido y almacenados en frascos de vidrio con tapa, identificados con la fecha de destilación, número de muestra y volumen contenido. Las muestras fueron congeladas a una temperatura de -18 °C hasta el momento en que se procedió al análisis por cromatografía de gases.

3.4.5 Parámetros cinéticos

En el presente trabajo se seleccionaron dos parámetros cinéticos para valorar las pruebas controladas de fermentación utilizando las levaduras y medios de fermentación antes descritos, con la finalidad de evaluar el rendimiento y la productividad en cada uno de los ensayos realizados.

3.4.5.1 Productividad de etanol (Q_p) definida como el cociente obtenido entre la diferencia entre las concentraciones de etanol final e inicial (g/L) y el tiempo de fermentación (h) expresado en gramos de etanol/L h y calculada según la ecuación 5 (Domingues *et al.*, 2001; Guimaraes *et al.*, 2010; Dragone *et al.*, 2011; Dinitz *et al.*, 2014; Gabardo *et al.*, 2014; Vincenzi *et al.*, 2014).

$$Q_p = \frac{(E_f - E_i)}{t} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde:

E_f = Concentración etanol final (g/L)

E_i = Concentración etanol inicial (g/L)

T = Tiempo de fermentación (h)

3.4.5.2 Rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) es el cociente obtenido entre la diferencia de las concentraciones de etanol final e inicial (g/L) y la diferencia de los azúcares reductores final e inicial), expresado en gramos de etanol / gramos de azúcares reductores consumidos y calculado según la ecuación 6 (Dragone, 2011; Ariyanti & Hadiyanto, 2013; Gabardo, 2014; Dinitz, 2014).

$$Y_{(E/S)} = \frac{(E_f - E_i)}{(S_f - S_i)} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde:

E_f = Concentración de etanol final (g/L)

E_i = Concentración de etanol inicial (g/L)

S_f = Concentración de azúcares reductores final (g/L)

S_i = Concentración de azúcares reductores inicial (g/L)

3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS

3.5.1 Determinación de proteína

La estimación de proteína se realizó en sueros y permeados de suero dulce de queso Blanco, en sueros y permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco, y en sueros y permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella, y se determinó por el método de titulación de Sørensen-Walker o más conocida como titulación formólica. Este método se fundamenta en la titulación de Sørensen, en la cual los grupos amino de los aminoácidos constituyentes de las proteínas (grupos $-NH_2$) son bloqueados con formaldehído neutralizado, para luego titular los grupos carboxilo ($-COOH$) con una solución alcalina valorada (Artica, 2014). Para ello se tomaron 9 mL de la muestra en un matraz erlenmeyer de 100 mL a las que se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína al 1% y se procedió a titular con solución de NaOH 0,1 N hasta viraje a rosa pálido. Después se adicionaron 2 mL de formaldehído neutralizado desarrollándose una acidez por bloqueo de los grupos básicos de las proteínas, haciendo que la que la muestra se torne incolora, para nuevamente titularse con solución de NaOH 0,1 N hasta viraje a rosa pálido. En esta determinación se tomó en cuenta el volumen de NaOH 0,1 N consumido en la segunda titulación. Para expresar el resultado en porcentaje (%) de proteína se multiplicó el volumen de NaOH 0,1 N consumido por el factor 2,10.

3.5.2 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores (AR) son aquellos que poseen un grupo carbonilo (grupo funcional) intacto y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas, ya que al menos tienen un $-OH$ hemiacetálico libre a la reacción con reactivo de Fehling, a la reacción de Benedict, a la reacción con reactivo de Tollens, y a la Reacción de Maillard (Hicks, 2001). La determinación de AR (lactosa principalmente) se realizó por duplicado en sueros y permeados de suero dulce de queso Blanco fresco, sueros y permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco, sueros y permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella, y en los concentrados de permeados obtenidos por ultrafiltración, hidrólisis de lactosa y concentrados por evaporación utilizados como medios de fermentación (con presencia o no de NaCl) durante las pruebas de

fermentación, que incluyen como AR la glucosa y galactosa procedente de la hidrólisis de la lactosa y ciertas cantidades de lactosa residual. La determinación de AR con el reactivo Fehling Causse-Bonnans se fundamenta en que los AR reducen en medio alcalino los iones cúpricos del reactivo de Fehling a iones cuproso (COVENIN 3107, 1994). En un matraz erlenmeyer de 250 mL se adicionaron 5 mL del reactivo A de Fehling, 5 mL del reactivo B de Fehling, 5 mL de ferrocianuro de potasio al 10% (método de Fehling Causse-Bonnans), llevándolo a ebullición en plancha de calentamiento PC620D (CORNING, Nueva York, EE. UU.) regulado de tal manera que el proceso comience a los 4 min y se mantenga hirviendo exactamente 6 min. Acabado este calentamiento se procedió a titular utilizando la solución de la muestra a analizar, hasta obtener una coloración clara, primero y, luego un color café. Los mililitros gastados de muestras fueron utilizados para calcular la concentración de AR presentes utilizando la ecuación 7.

$$\text{Azúcares reductores (\%)} = \frac{T \times 1000}{V} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

T = Título del licor de Fehling.

V = Volumen de la dilución de suero consumido en la titulación.

3.5.3 Determinación del contenido de grasa

El contenido de grasa se determinó en sueros y permeados de suero dulce de queso Blanco fresco, dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco, y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella, y se realizó mediante el método de Gerber establecido por la norma Venezolana COVENIN 1053-82 (1982) que corresponde a la norma internacional ISO 2446. Este método se fundamenta en que el ácido sulfúrico oxida e hidroliza los componentes orgánicos de la envoltura protectora de los glóbulos de grasa, las fracciones proteicas del suero y la lactosa. El alcohol isoamílico adicionado facilita la liberación de la grasa y durante el proceso de centrifugación se logra su separación por densidades (densidad 0,99 g/cm³) del resto de componentes (densidad 1,030 g/cm³), facilitando la lectura del contenido de grasa directamente en la escala graduada del butirómetro.

Para esta determinación se utilizaron butirómetros Gerber (escala 0-1%), dosificándose 10 mL de H₂SO₄ (d = 1,82) y 11 mL de la muestra a analizar, la cual se agregó cuidadosamente por las paredes del butirómetro, y finalmente se añadió 1 mL de alcohol isoamílico. Se tapó el butirómetro con tapón de goma y se agitó vigorosamente con movimientos alternos arriba y abajo, y seguidamente se introdujo el butirómetro en la centrífuga Gerber durante 5 min y se realizó la lectura directa del contenido de grasa en la columna con escala graduada del butirómetro.

3.5.4 Determinación de sólidos solubles mediante refractometría

Es un método sencillo y práctico que permitió determinar el incremento de los sólidos solubles hasta el valor deseado durante el proceso de concentración por evaporación de la mezcla de permeados. En la determinación de sólidos solubles se utilizó un refractómetro digital de mano (ATAGO Pocket, PAL-1 BLT/i, Washington, EE. UU.) con intervalo de lectura entre 0 y 53 °Brix, y el análisis se realizó depositándose 0,3 mL del concentrado de permeado de suero de quesería a temperatura de 25 °C en el prisma del refractómetro para realizar la lectura. Los análisis fueron hechos por duplicado y correspondió a los sólidos solubles contenidos en la muestra expresados en grados Brix a 25 °C.

3.5.5 Determinación de cloruros

La determinación de cloruros se realizó por duplicado en los sueros y permeados de suero objeto de estudio y en los concentrados de permeados obtenidos por ultrafiltración, hidrólisis de la lactosa, y concentrado por evaporación (medios de fermentación con sin NaCl). El método se fundamenta en la medida de turbidez producida por la precipitación del cloruro de plata (AgCl) en solución acidulada con ácido nítrico según la norma Venezolana COVENIN 369-82 (1982). Para ello se tomó un matraz erlenmeyer de 250 mL y se procedió a pesar en la balanza analítica 5 g de la muestra; posteriormente se adicionó 50 mL de agua destilada y se mezcló, para después añadirse 3 gotas de solución de cromato de potasio al 50%. El matraz se colocó en un agitador magnético y en agitación continua se valoró a partir de una bureta enrasada con nitrato de plata 0,17 N hasta observar la aparición de un precipitado pardo rojizo.

Los resultados obtenidos se expresaron como Cl^- o NaCl (% en peso) según las ecuaciones 8 y 9:

$$\text{Cl}^- (\%) = V \times 0,17 \times 0,0355 \times \frac{100}{5} \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$\text{NaCl} (\%) = V \times 0,17 \times 0,0585 \times \frac{100}{5} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

V = Volumen de AgNO_3 (mL) utilizados en la valoración.

3.5.6 Determinación del pH

La determinación del pH se realizó por duplicado en los sueros, permeados de suero y concentrados de permeados obtenidos por ultrafiltrado, hidrólisis de la lactosa y concentrado por evaporación (medios de fermentación con o sin NaCl). El método se fundamenta en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro) según lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 1315-79 (1979). Para ello se utilizó un pHmetro y electrodo (HANNA instruments, Woonsocket, EE. UU.), realizándose la determinación por duplicado.

3.5.7 Determinación de recuentos totales de levaduras

La determinación de los recuentos totales de levaduras se realizó según el método indicado en la norma Venezolana COVENIN 1337-90 (1990), por siembra en superficie de 1 mL de las muestras diluidas en 9 mL de tampón fosfato 0,2 M (pH 7,2; elaborado con fosfato de potasio dihidrógeno y carbonato de sodio) en medio Agar Papa Dextrosa, incubándose por 72 h a 20-25 °C, procediéndose a la lectura por separado de mohos y levaduras. Para su recuento se seleccionaron aquellas placas que presentaron entre 10 y 100 colonias. Los resultados se expresaron según el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/mL) de muestra en base logarítmica.

3.6 DETERMINACIÓN DE ETANOL Y METANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN A LA LLAMA (GC-FID)

La cromatografía GC-FID fue seleccionada en la presente investigación ya que además de separar, identificar y cuantificar compuestos volátiles en una gran variedad de muestras, entre ellas alcoholes, es sensible, selectiva y está disponible en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional Experimental del Táchira. Con la finalidad de determinar la calidad de los destilados obtenidos se decidió analizar, además de etanol, metanol como otro posible componente que pudiera conferir toxicidad al producto, considerando que, de acuerdo a los resultados emanados de este trabajo, se recomendará utilizar los destilados derivados del lactosuero estudiado en la elaboración de bebidas alcohólicas.

3.6.1 Instrumentación

El cromatógrafo de gases utilizado fue un Thermo Finnigan, modelo Trace GC Chromapack CP-9001 (Termo Finnigan, Waltham, EE. UU.), provisto con un detector fotométrico de llama (FID) y equipado con una columna capilar Rtx-Wax de 30 m de longitud por 0,25 mm de diámetro interno y 0,05 μm de espesor de película (Ringoos, NJ, EE. UU.). Para las inyecciones se dispuso de un automuestreador Split-splitless 3000 (Termo Finnigan).

3.6.2 Estándar interno

El análisis cuantitativo del método se basó en la estandarización interna, utilizando para este fin el 1-butanol grado analítico (Merck KGaA, Frankfurt, Alemania) de 99,9% de pureza, el cual fue adicionado a las soluciones estándar a una concentración de 4,86 g/L.

3.6.3 Procedimiento de calibración

Se utilizaron individualmente etanol y metanol de grado analítico y de 99,9% de pureza (Merck KGaA) para preparar por dilución en agua destilada soluciones a concentraciones de 4,74 y 23,70 g/L de ambos alcoholes a las que se les adicionó el estándar interno (1-butanol) a una concentración de 4,86 g/L. Las condiciones de operación utilizadas en el GC-FID para la determinación y cuantificación de alcoholes fueron las definidas por Rodríguez (2014) y se muestran en la Tabla 10.

Con estos parámetros y utilizando la columna descrita en el apartado 3.1.1 se realizaron inyecciones individuales (1 μL) de las soluciones mencionadas (4,74 y 23,70 g/L), determinando los tiempos de retención para etanol y metanol.

Tabla 10. Condiciones de operación del GC-FID para la determinación de etanol y metanol.

Variable	Gas/Parámetro	Condición de operación
Flujo de gas de arrastre	Helio	30 mL/min
Inyector	Temperatura	200 °C
	Volumen de inyección	1,0 μL
	Relación de división (Split ratio)	300
Horno	Temperatura inicial	55 °C durante 3 min
	Rampa de calentamiento	10 °C/min
	Temperatura final	120 °C durante 2 min
Duración del método	Período	11,5 min
Detector (FID)	Temperatura	240 °C
	Caudal de gases	H ₂ : 40 mL/min Aire: 400 mL/min

Fuente: Rodríguez (2014).

Posteriormente se preparó una solución de metanol y etanol a una concentración promedio de 15,80 g/L con adición del estándar interno (84,86 g/L) para verificar su separación, obteniendo una alta resolución entre ellos. En el Anexo 1a se muestra el cromatograma de separación de los analitos. La identificación de los alcoholes y el estándar interno se realizó en base a los tiempos de retención obtenidos para cada uno de manera individual. La elución del metanol fue a los 4,06 min, para el etanol a los 4,88 min y del estándar interno a los 11,18 min, período relativamente corto para el análisis cromatográfico. Los tiempos de retención no mostraron variaciones significativas en las diferentes series cromatográficas, lo que indica una alta precisión del método en la retención de los analitos.

3.6.4 Curvas de calibración

La etapa de calibración analítica se realizó mediante un modelo de línea recta, que consiste en encontrar la recta de calibrado que mejor ajuste a una serie de n puntos experimentales donde cada punto se encuentra definido por una variable x (variable independiente,

generalmente concentración del analito) y una variable y (variable dependiente, generalmente respuesta instrumental).

Para los alcoholes en estudio (etanol y metanol) las curvas de calibración se realizaron a 5 niveles de concentración en un intervalo lineal de 4,74 a 94,80 g/L, agregando en cada una de ellas el estándar interno a una concentración constante de 4,86 g/L. En la Tabla 11 se presenta el volumen y la masa de etanol, metanol y 1-butanol absolutos utilizados para la preparación de las soluciones estándar (5 mL) en los cinco niveles de concentración

La optimización del procedimiento se evaluó en base a la selectividad y linealidad del método aplicado. La selectividad se analizó verificando la existencia o no de picos diferentes a los analitos estudiados durante el tiempo de análisis según el programa establecido. En el Anexo 1b se muestra un cromatograma obtenido de una muestra del estándar interno (1-butanol) en solvente en el que se destaca que no hay señales que interfieran con el tiempo de retención de los alcoholes en estudio, lo que indica que la metodología seguida demuestra ser específica para los analitos estudiados ya que permite separar adecuadamente y sin interferencias las señales de metanol, etanol y el estándar interno.

Tabla 11. Volumen y masa de etanol, metanol y 1-butanol absolutos para la preparación de soluciones estándar en 5 niveles de concentración.

Nivel	Etanol/Metanol absoluto				1-Butanol absoluto (Estándar interno)			
	Vol (μ L)	Masa (g)	Vol aforo (mL)	Con (g/L)	Vol (μ L)	Masa (g)	Vol aforo (mL)	Con (g/L)
1	30	0,0237	5	4,74	30	0,0234	5	4,86
2	100	0,0790	5	15,80	30	0,0234	5	4,86
3	150	0,1185	5	23,70	30	0,0234	5	4,86
4	300	0,2370	5	47,40	30	0,0234	5	4,86
5	600	0,4740	5	94,80	30	0,0234	5	4,86

Vol: Volumen; Con: Concentración.

La linealidad se evaluó en un intervalo de 1,0 a 20,0 g/L, considerando la relación entre la concentración del analito y la concentración del estándar interno ($C_{\text{analito}}/C_{\text{estándar}}$) y el área

del analito entre el área del estándar interno ($A_{\text{analito}}/A_{\text{estándar}}$), y se valoró analizando las curvas de calibración y el coeficiente de correlación (R^2) de los alcoholes estudiados. En el Anexo 2 se muestran las curvas de calibración para el etanol y metanol. La linealidad sobre el intervalo considerado para la relación de concentraciones del analito y el estándar interno (1,0 a 20,0 g/L) en ambos alcoholes fue satisfactoria, ya que presentaron un coeficiente de correlación (R^2) mayor de 0,998 que se ubica por encima del nivel de aceptación (0,98) descrito por Miller & Miller (2002). Las ecuaciones lineales obtenidas de las curvas de calibración para etanol y metanol se muestran en el Anexo 2.

$$y = a + bx \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde:

y = área analito / área del estándar interno ($A_{\text{analito}}/A_{\text{estándar}}$)

x = concentración del analito / concentración del estándar interno ($C_{\text{analito}}/C_{\text{estándar}}$)

b = pendiente de la recta

a = ordenada en el origen

Para cuantificar la concentración de etanol y metanol presente en las muestras investigadas, se adicionó el estándar interno a la concentración establecida (4,86 g/L) en cada muestra a analizar y se inyectó al GC/FID. Del cromatograma obtenido se determinó la relación entre las áreas del analito y del estándar interno obteniéndose de la curva de calibración la relación de concentraciones y con ella la concentración de cada muestra.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La lectura, manipulación y validación de la base de datos y el posterior análisis estadístico de los datos del medio de fermentación y de los procesos fermentativos se ha realizado con el software SAS System v 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

Las decisiones estadísticas se han tomado fijando como nivel de significación el valor 0,05.

3.7.1 Análisis descriptivo

Para cada variable de interés, se han obtenido las tablas de resumen con los estadísticos siguientes: N (número de observaciones), media, mediana, desviación estándar, mínimo y

máximo, y en el caso del estudio de fermentación estratificando por tipo de levadura, % de concentración de sal y día de seguimiento. En el estudio de fermentación también se ha dibujado la media y su desviación estándar en un gráfico de líneas para visualizar la evolución de cada parámetro de interés a lo largo de los 5 días de seguimiento, diferenciando por tipo de levadura y concentración de sal. Este gráfico permite hacerse una idea de dónde se van a detectar mayores diferencias entre días de seguimiento y concentraciones de sal.

3.7.2 Análisis principal de los datos de fermentación

Se excluyó del análisis de modelización del experimento preliminar donde se compararon las tres levaduras realizándose solo una producción utilizando dos réplicas. En este experimento preliminar se observó que la levadura *K. marxianus* fue productora de niveles de etanol muy bajos en comparación al resto de levaduras, y por ello fue excluida del experimento principal de fermentación.

Para el experimento principal utilizando las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, y para las variables de interés se ha analizado la evolución a lo largo de los días, la evaluación del efecto de la concentración de sal y la comparativa de las levaduras.

3.7.2.1 Evolución a lo largo de los días

Para analizar cada una de las variables respuesta de interés (pH, AR, Etanol, Q_p y $Y_{E/S}$), para cada levadura y para cada nivel de concentración de sal se ha implementado un Modelo Lineal General con efectos aleatorios donde el día se considera un efecto fijo y la producción anidada en el factor día (la réplica experimental) se considera un factor aleatorio.

Se han realizado todas las comparaciones 2 a 2 para la detección de subconjuntos homogéneos implementando la corrección de Tukey para multiplicidad de contrastes a nivel de día.

3.7.2.2 Evaluación del efecto de la concentración de sal

Para analizar el efecto de la concentración de sal en cada una de las variables respuesta de interés (AR día 0 – día 5, Etanol, Q_p y $Y_{E/S}$), para cada levadura se ha implementado un

Modelo Lineal General con efectos aleatorios donde la concentración de sal se considera un efecto fijo y la producción (la réplica experimental) se considera un factor aleatorio.

Se han realizado todas las comparaciones 2 a 2 para la detección de subconjuntos homogéneos implementando la corrección de Tukey para multiplicidad de contrastes a nivel de levadura.

3.7.2.3 Comparativa de las levaduras

En la comparación de las levaduras se han analizado las variables respuesta Etanol, Q_p y $Y_{E/S}$. Se ha realizado un modelo para el día 1, que se toma como basal, para el día 5 (final del experimento) y para la diferencia entre ambos (incremento/decremento de la variable respuesta). Se ha calculado la variable AR como la diferencia entre el día 0 y el día 5. Para esta variable también se ha valorado la existencia de diferencias entre levaduras.

Para cada uno de estos días (Día 1, Día 5 y diferencia entre día 5 y día 1 o día 0 – día 5 en los AR) y para cada nivel de concentración de sal se ha implementado un Modelo Lineal General con efectos aleatorios donde el tipo de levadura se considera un efecto fijo y la producción anidada en el factor levadura se considera un factor aleatorio.

Se han realizado todas las comparaciones 2 a 2 para la detección de subconjuntos homogéneos implementando la corrección de Tukey para multiplicidad de contrastes a nivel de levadura.

Capítulo IV

Resultados y discusión

4.1 PERMEADOS DE SUERO DE QUESERÍA Y MEDIO DE FERMENTACIÓN

4.1.1. Caracterización de sueros de quesería de pasteurizadora Táchira C.A.

El suero de quesería es utilizado como materia prima para la obtención de productos como el requesón a partir de la precipitación por temperatura de las proteínas de suero, separación de las proteínas para la producción de fórmulas en polvo para atletas, niños y personas de la tercera edad (Mendes da Silva, 2011), crema de suero obtenida del descremado del suero y utilizado para la elaboración de mantequilla de suero, cremas acidificadas de suero, queso cremas de suero, aderezos de suero, y como emulgente para postres y confitería (Poveda, 2013).

Con los permeados desgrasados y desproteinizados se puede obtener abono por fermentación para uso agrícola, ácido acético, ácido láctico, metanol, butanol, glicerina, bacteriocinas, levaduras para consumo animal o humano, agentes espesantes, y enzimas como la β -galactosidasa, entre otros (Nielsen, 2003; Bansal, 2008; Beristain-Bauza *et al.*, 2012; Eldeleklioglu, 2013; Whang, 2013).

Del análisis realizado entre todas las aplicaciones descritas, se decidió elaborar etanol por razones tecnológicas relacionadas a la complejidad de la operación y amplio uso en diferentes tipos de industrias (bebidas alcohólicas, energía, química, cosmética y farmacéutica), demanda de producto y precio en el mercado internacional.

Diariamente en las instalaciones de la Pasteurizadora Táchira en la sección procesadora de queso se obtienen unos 112.500 L de suero de la fabricación de quesos frescos, semimadurados y madurados, con un contenido promedio de proteínas totales en los sueros de quesería entre 0,7 y 1,0%. Gerningon *et al.* (2009) reportaron valores de proteína totales en suero de queso tipo Suizo de $0,82\pm 0,00\%$, en suero de queso Cheddar de $0,89\pm 0,05\%$ y en suero de queso Raclette de $1,00\pm 0,05\%$. Das *et al.* (2016) estudiaron la producción de etanol obtenido a partir de permeados de suero de queso, indicando que los contenidos de proteína residual en los sueros dulces utilizados para obtener los permeados se situaron entre 0,80 y 1,00%.

En la producción de quesos frescos, Pasteurizadora Táchira produce tres tipos de sueros: (1) dulce de queso Blanco fresco marca Paisa; (2) dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco marca Paisa; y (3) dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella marca Paisa. La

composición de estos sueros se detalla en la Tabla 12 y corresponden a la caracterización de 9 lotes de cada uno de los tipos de suero.

Tabla 12. Composición de sueros de quesería elaborados por Pasteurizadora Táchira C.A.

Tipo de suero	Proteína (%)	Azúcares reductores (%)	Grasa (%)	Cloruros (%)	NaCl (%)	pH
Dulce de queso Blanco fresco	0,8 ±0,15	4,7±0,21	0,3±0,1	0,2±0,02	–	6,5±0,14
Dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco	0,8±0,15	4,3±0,24	0,3±0,1	–	3,3±0,14	6,5±0,14
Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	0,8±0,15	4,8±0,23	0,3±0,1	0,2±0,02	–	5,8±0,07

En el suero ligeramente ácido de queso Mozzarella las proteínas residuales fluctuaron entre 0,65 y 0,95%. Gerningon *et al.* (2009) estudiaron las características fisicoquímicas del suero de queso Mozzarella y de las aguas de hilado en comparación con otros tipos de suero, obteniendo 0,68±0,03% de proteínas en el suero de queso Mozzarella, valores similares a los encontrados en este estudio.

El contenido de azúcares reductores (principalmente lactosa) del suero dulce y dulce ligeramente salado de queso Blanco fue de 4,49-4,91% y de ~4,06-4,54% para el suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco. Hadiyanto *et al.* (2014) caracterizaron 20 lotes de suero dulce, obteniendo valores de lactosa entre 4,50 y 5,00% siendo similares a los alcanzados en el presente trabajo, y a los reportados por Zadow (1994) y por Singh & Galy (1984) en sus estudios de composición de sueros de quesería en el que mostraron contenidos promedios de lactosa de 4,90 y 5,00%, respectivamente. Gernigon *et al.* (2009) estudiaron los sueros dulces sin deslactosar, mostrando cantidades de lactosa de 4,50-5,00%. Dragone *et al.* (2011) investigaron las condiciones óptimas para maximizar la producción de etanol con *Kluyveromyces fragilis* a partir de sueros de queso con contenidos de lactosa entre 4,50 y 5,00%.

En el caso de los sueros dulces ligeramente ácidos de queso Mozzarella se obtuvo de 4,57 a 5,03% de azúcares reductores. Estos valores son similares a los reportados por Gernigon *et al.* (2009) quienes obtuvieron concentraciones de lactosa del 4,13±0,06% en sueros ácidos

de queso Mozzarella obtenidos por acidificación microbiológica de la cuajada utilizando *Streptococcus thermophilus*. De Wyt (2001) obtuvo concentraciones de lactosa del 4,48% en sueros de queso Mozzarella, valores que fueron relacionados a la producción de ácido láctico por efecto del consumo de la lactosa como sustrato por las bacterias ácido lácticas del cultivo láctico adicionado a la leche.

Los sueros obtenidos del proceso de fabricación de queso Blanco y Mozzarella presentaron valores de grasa entre 0,20 y 0,40%. Dentro de las diversas causas que pueden llegar a producir mayores pérdidas de grasa durante la elaboración de queso podemos encontrar: (1) la agitación de la leche en la tina quesera en el que se forman granos de mantequilla que se eliminan con el lactosuero (Amiot, 1991); (2) temperaturas superiores a 32 °C durante la coagulación de la leche que favorece la pérdida de grasa en el suero (Guerrero-Haber *et al.*, 2011); (3) el cortado excesivo y la agitación demasiado violenta de una cuajada blanda; (4) un calentamiento muy rápido; y (5) una presión demasiado fuerte al principio del prensado (Amiot, 1991). Zadow (1994) estudió la composición de sueros dulces e indicó que el contenido de grasa promedio fue de 0,10%. Prazeres *et al.* (2012) realizaron una revisión sobre el manejo de los sueros de quesería, reportando que los sueros dulces contienen de 0,06 a 0,50% de grasa.

La concentración de cloruros en los sueros dulces de queso Blanco fresco varió entre 0,18 y 0,22. Callejas *et al.* (2012) reportaron valores de 0,20 a 0,22% de cloruros en sueros dulces de quesería, valores similares a los obtenidos en esta investigación y a los obtenidos por Panesar *et al.* (2007) que trabajando en la producción de ácido láctico a partir de sueros de quesería, reportaron concentraciones de cloruros de 0,20 a 0,22%. Tovar *et al.* (2012) analizaron sueros dulces de queso fresco obtenidos por coagulación enzimática, obteniendo valores promedio de cloruros en suero dulce de 0,10%, resultados algo menores a los reportados por los otros autores.

En los sueros dulces ligeramente salados de queso Blanco fresco el contenido de NaCl varió entre 3,2 y 3,4%. Acosta (2015) reportó que los sueros dulces ligeramente salados de queso fresco Blanco Hondureño presentan un contenido de NaCl que varía entre 2,0 y 3,5%.

El pH de los sueros dulces y dulces ligeramente salados de queso Blanco fresco se situó en el intervalo de 6,36 -6,64%. Tovar *et al.* (2012) estudiaron los métodos tradicionales para la obtención de aislados y concentrados de proteínas de suero, indicando que son sueros dulces aquellos obtenidos a pH entre 5,00 y 6,60 por coagulación enzimática, utilizando soluciones enzimáticas de quimosina. Gerningon *et al.* (2009) reportaron valores de pH en sueros dulces de queso tipo Suizo de $6,52\pm 0,01$ y sueros dulces de queso fresco de $6,42\pm 0,14$, resultados que se encuentran dentro de la especificación de sueros dulces. El pH del suero dulce ligeramente ácido fue de 5,73-5,87 valores que están dentro de la especificación del suero de queso Mozzarella cuando se usa ácido cítrico como acidulante (Kindstedt, 1992; Guinee, 2004).

4.1.2. Caracterización de permeados de pasteurizadora Táchira C.A.

En las instalaciones de la Pasteurizadora Táchira se produce un total aproximado de permeados de 108.960 L/día, variando las cantidades de acuerdo a los pedidos de queso del área comercial. Son tres los tipos de permeados procedentes de sus sueros correspondientes que se obtienen durante la fabricación de quesos frescos: (1) dulce de queso Blanco fresco; (2) dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco; y (3) dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella. A continuación, se describe la composición y características de estos permeados.

4.1.2.1 Permeado de suero dulce de queso Blanco fresco

El permeado de suero dulce de queso Blanco fresco es el subproducto obtenido de la fabricación de este queso fresco después de un proceso de desproteinización para la obtención de requesón. La Tabla 13 presenta las características fisicoquímicas de 9 lotes de permeados de suero dulce de queso Blanco Paisa.

Los contenidos de proteína residuales en los permeados fueron muy constantes con pequeñas variaciones en 2 lotes y con un valor promedio de proteína de $0,47\pm 0,09\%$. Vincenzi *et al.* (2014) obtuvieron resultados similares en el estudio de caracterización del permeado procedente de la fabricación de requesón y posteriormente utilizado en la producción de etanol, determinando la composición de 20 lotes, donde la proteína presentó un valor promedio de $0,47\pm 0,17\%$. Pispönen *et al.* (2013) también obtuvieron resultados similares en el estudio de caracterización de 15 muestras de permeados obtenidos en la

fabricación de requesón que utilizaron posteriormente como materia prima para la producción de lactosa anhidra, obteniendo un contenido residual de proteína de 0,50%. Sansoneti *et al.* (2011) describieron un 0,15% de proteína residual en los permeados obtenidos tras la fabricación de requesón y empleados en la producción de etanol utilizando *Kluyveromyces marxianus*, siendo este contenido de proteína más bajo que los obtenidos en el presente estudio. El contenido de proteína en los permeados de suero depende principalmente de los parámetros de proceso utilizados durante la precipitación de las proteínas de suero para la producción de requesón (Vincenzi *et al.*, 2014).

Tabla 13. Caracterización fisicoquímica de permeados de suero dulce de queso Blanco Paisa.

Muestra	Proteína (%)	Azúcares reductores (%)	Cloruros (%)	pH
1	0,63±0,00	4,62±0,02	0,23±0,00	6,11±0,01
2	0,42±0,00	4,84±0,01	0,27±0,00	5,85±0,02
3	0,42±0,00	4,96±0,02	0,24±0,00	5,94±0,02
4	0,42±0,00	4,76±0,02	0,26±0,01	5,93±0,01
5	0,63±0,00	4,29±0,01	0,22±0,00	5,94±0,01
6	0,42±0,00	4,44±0,02	0,22±0,00	5,92±0,01
7	0,42±0,00	4,62±0,01	0,23±0,01	6,18±0,02
8	0,42±0,00	4,62±0,02	0,23±0,00	6,01±0,01
9	0,42±0,00	4,88±0,01	0,24±0,01	5,82±0,01
$\bar{x} \pm DS$	0,47±0,09	4,70±0,22	0,24±0,02	5,97±0,12

\bar{x} : Promedio de valores, DS: Desviación estándar.

Los parámetros de proceso los podemos dividir según el tipo de suero (dulce, salado y ácido), por la temperatura de precipitación (entre 85 y 93 °C) y en el ácido o sal a utilizar para la precipitación de la proteína de suero (CaCl₂, ácido cítrico, ácido acético, entre otros), donde un menor contenido de proteína residual en el permeado está asociado a un proceso más eficiente de recuperación de las proteínas en los sólidos de suero (requesón).

La grasa en todos los lotes de permeados de suero dulce analizados fue inapreciable y no cuantificable con la metodología utilizada en este estudio, indicando una gran eficiencia al retener la totalidad de la grasa durante el proceso de elaboración del requesón. Estos valores coinciden con los reportados por Vincenzi *et al.* (2014) en 20 lotes de permeados de suero obtenidos de la elaboración de requesón con un contenido de grasa no cuantificable. Sin embargo, otros autores (Kargi *et al.*, 2006; Ozmihci *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2016) han reportado pequeñas cantidades de grasa (~0,06%) en permeados dulces de quesería.

Los azúcares reductores (principalmente lactosa) fue el componente mayoritario de los permeados analizados y el de mayor interés en este estudio, por ser el sustrato utilizado por las levaduras durante la fermentación para la producción de etanol alimentario, con valores medios en los permeados de suero de queso Blanco de $4,70 \pm 0,22$. Vincenzi *et al.* (2014) obtuvieron valores promedios de 4,76% de lactosa en permeados de queso Ricotta utilizados para la producción de etanol, valores similares a los reportados por Sansonetti *et al.* (2010) con un promedio de lactosa de 4,85%. Das *et al.* (2016) estudiaron la producción de etanol a partir de permeados de suero de queso, mostrando valores de lactosa entre 4,50 y 5,00%.

La leche en Venezuela contiene entre 0,07 y 0,11 % de cloruros (COVENIN 798, 1994), y ya que durante la elaboración del queso se adiciona CaCl_2 a la leche (0,2 g/L), este pasa al suero incrementando el contenido de cloruros en el permeado de suero dulce. Los resultados obtenidos de los análisis realizados en los permeados de sueros dulces estudiados mostraron su presencia en el intervalo de 0,22-0,27%.

El pH de los permeados analizados se situó entre 5,81 y 6,20. Pispunen *et al.* (2013) reportaron en permeados de sueros de Ricotta un pH promedio de 5,51, mientras que Vincenzi *et al.* (2014) obtuvieron valores de pH en permeados de suero de Ricotta de $5,10 \pm 0,49$ siendo valores de pH más bajos a los reportados en el presente trabajo.

4.1.2.2 Permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco

Estos permeados se obtienen durante la producción de queso Blanco adicionado de sal. La Tabla 14 muestra las características fisicoquímicas de los permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco, observándose que los valores de proteína variaron

entre 0,42 y 0,63%, con un valor promedio de 0,50%, siendo ligeramente superior en comparación a los permeados de suero dulce de queso Blanco sin sal (0,47%). Por otra parte, los sólidos de suero obtenidos por precipitación para la elaboración de requesón presentaron una textura con mayor arenosidad y humedad respecto a los obtenidos a partir de suero dulce sin sal.

De nuevo la cantidad de grasa obtenida en este tipo de permeados fue despreciable y no cuantificable por la metodología analítica empleada, repitiéndose los resultados obtenidos en el análisis de grasa de los permeados de suero dulce de queso Blanco sin sal, y a los obtenidos por Vincenzi *et al.* (2014) en productos similares.

Tabla 14. Caracterización fisicoquímica de permeados de suero dulce ligeramente salado de queso Blanco Paisa.

Muestra	Proteína (%)	Azúcares reductores (%)	NaCl (%)	pH
1	0,63±0,00	4,51±0,01	3,97±0,01	4,82±0,02
2	0,42±0,00	4,14±0,01	3,28±0,02	4,71±0,01
3	0,63±0,00	4,37±0,02	3,44±0,01	4,83±0,01
4	0,42±0,00	4,08±0,01	2,57±0,01	4,7±0,02
5	0,63±0,00	4,65±0,01	3,74±0,01	4,89±0,02
6	0,42±0,00	4,32±0,01	2,80±0,01	4,54±0,01
7	0,42±0,00	4,58±0,02	4,04±0,01	4,68±0,02
8	0,42±0,00	4,00±0,01	2,98±0,01	4,56±0,01
$\bar{x} \pm DS$	0,50±0,11	4,33±0,24	3,35±0,54	4,56±0,470

\bar{x} : Promedio de valores, DS: Desviación estándar.

En el análisis de los azúcares reductores (principalmente lactosa) de los permeados de sueros dulces ligeramente salados procedentes de la elaboración de queso Blanco, se obtuvo valores entre 4,00 y 4,65% de lactosa. La disminución del contenido de lactosa en este permeado está relacionada a la adición de salmuera en tina (1000 L con 23 °Baume) de

fabricación, diluyendo el contenido de lactosa en aproximadamente 13,3% comparado con el suero dulce de queso Blanco.

Estos permeados presentaron valores de NaCl entre 2,57 y 4,04%, con una media de $3,35 \pm 0,54\%$, valor que se situó dentro de las especificaciones de 3,20-3,40% en el suero salado utilizados para el salado de la cuajada de queso Blanco marca Paisa, para finalmente poder obtener un queso Blanco con un contenido entre 1,5 y 2,0% de NaCl (Pasteurizadora Táchira, C.A). Estos resultados son similares a los reportados por Awad (2009) en suero salado de queso Cheddar que contiene entre 2 y 5% de NaCl, y diferentes a los de sueros salados obtenidos de la fabricación de queso Domiati que contiene entre 8 y 15% de NaCl.

El pH medio obtenido en los permeados procedentes de suero dulce ligeramente salado fue 4,56 (Tabla 14), y corresponde a un pH menor a los obtenidos en permeados de suero de queso Blanco (5,97). Esto se debe principalmente al uso de ácido cítrico durante la precipitación de los sólidos de los sueros dulces ligeramente salados, clasificando estos permeados como ácidos y ligeramente salados. Pintado *et al.* (2001) indicaron que el pH de los permeados de suero depende de la cantidad y tipo de ácido orgánico empleado en la producción de requesón. Así, Bergamaschi *et al.* (2016) utilizaron en la elaboración de Requesón vinagre de vino para precipitar la fracción proteica del suero de quesería a una temperatura de 90 °C, obteniendo un pH de 4,50-4,7 en los permeados procedentes de su fabricación.

4.1.2.3 Permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella

Los permeados procedentes de sueros dulces ligeramente ácidos son obtenidos en la fabricación de queso Mozzarella marca Paisa y posterior extracción de requesón, quedando un permeado rico en lactosa y sales minerales. La Tabla 15 muestra las características fisicoquímicas de los permeados procedentes de sueros dulces ligeramente ácidos.

Los valores de proteína encontrados en este tipo de permeado fluctuaron entre 0,21 y 0,63% obteniéndose como valor promedio $0,51 \pm 0,14\%$, observándose un ligero incremento de la proteína en el permeado de suero de Mozzarella, con respecto a los permeado procedentes de los sueros de queso Blanco fresco. Esto se debe principalmente al trabajo en cuba de la cuajada de queso Mozzarella y a la adición de ácido cítrico anhidro a la leche con la finalidad de disminuir el pH a valores entre 5,80 a 5,90.

En este caso tampoco se encontró grasa en los permeados procedentes de sueros de queso Mozzarella, resultados similares a los obtenidos en el resto de permeados estudiados, los azúcares reductores presentan valores de $4,79 \pm 0,12$ al ser acidificada la leche con ácido cítrico (procedimiento químico) sin provocar variación en la concentración de los azúcares reductores de la leche con respecto al suero, como sí sucede cuando usamos bacterias lácticas para acidificar la cuajada, que utilizan los azúcares reductores como sustrato para la producción de ácido láctico. La cantidad de cloruros obtenidos en los permeados de suero ligeramente ácido se situó entre 0,19 y 0,22%, valores similares a los que presentaron los permeados de suero dulce procedente de queso Blanco fresco.

Tabla 15. Caracterización fisicoquímica de los permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella marca Paisa.

Muestra	Proteína (%)	Azúcares reductores (%)	Cloruros (%)	pH
1	0,63±0,00	4,62±0,01	0,19±0,01	5,09±0,01
2	0,63±0,00	4,96±0,02	0,22±0,01	5,12±0,01
3	0,42±0,00	4,91±0,01	0,22±0,01	5,14±0,01
4	0,63±0,00	4,62±0,01	0,22±0,01	5,14±0,01
5	0,63±0,00	4,69±0,01	0,21±0,01	5,07±0,00
6	0,42±0,00	4,84±0,01	0,19±0,01	5,30±0,01
7	0,42±0,00	4,88±0,01	0,20±0,01	5,17±0,00
8	0,63±0,00	4,80±0,01	0,20±0,01	4,94±0,01
9	0,21±0,00	4,80±0,01	0,20±0,01	5,09±0,00
$\bar{x} \pm DS$	0,51±0,14	4,79±0,12	0,21±0,02	5,12±0,09

\bar{x} : Promedio de valores, DS: Desviación estándar.

El pH promedio obtenido en estos permeados fue de 5,12, debido al efecto inicial del ácido cítrico en la disminución del pH en la leche hasta un pH de 5,80-5,90, y posteriormente al efecto del cultivo de *Streptococcus thermophilus* que se adiciona a la leche de quesería y se

desarrolla durante la elaboración del queso, provocando disminución del pH por producción de ácido láctico a partir de la lactosa presente en el suero.

La producción de Mozzarella implica una fase de la acidificación fuerte de la leche o la cuajada. La plastificación de la cuajada se da en agua caliente y se lleva a cabo por fermentación microbiológica de la lactosa en el ácido láctico (procedimiento biológico) o por complemento directo de un agente acidificante a la leche (procedimiento químico) antes de la coagulación para obtener un pH entre 5,80 y 5,90 (Kindstedt, 1992). El pH obtenido en estos permeados fue de 5,12, debido al efecto inicial del ácido cítrico y posteriormente al efecto del cultivo de *Streptococcus thermophilus* que se adiciona a la leche de quesería y se desarrolla durante la elaboración del queso, provocando disminución del pH por producción de ácido láctico a partir de la lactosa presente en el suero. Los permeados obtenidos a partir de la producción de Mozzarella se pueden clasificar como ligeramente ácidos. Según la investigación realizada por Guinee (2004), en quesos producidos con pH de 5,9 (por acidificación directa con ácido cítrico) y pH de 5,5 (acidificación directa y adición de cultivos microbianos), se observó una mayor capacidad de estiramiento y fluidez en los quesos acidificados a pH de 5,5; por otro lado y en ambos casos (con pH de 5,5 y de 5,9) los niveles de calcio fueron similares. Los valores de pH obtenidos de los permeados en el presente trabajo son normales para un proceso de fabricación de queso Mozzarella utilizando un proceso combinado por acidificación directa con ácido cítrico y uso de cultivo láctico.

4.1.3. Medio de fermentación

Para la obtención de los medios de fermentación se realizaron mezclas utilizando diferentes proporciones de cada uno de los permeados de sueros dulces de queso Blanco marca Paisa, permeados de sueros dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y permeados de sueros dulce ligeramente salado de queso Blanco marca Paisa, con el objetivo de producir medios de fermentación sin y con presencia de NaCl (1 y 2%). Las mezclas de 40 L una vez realizadas fueron ultrafiltradas obteniendo un permeado compuesto principalmente por azúcares reductores y sales minerales, procediendo a su hidrólisis con la enzima β -galactosidasa (Lactozym®Pure 2600L, Novozyme, Jsvaerd, Denmark) por 15 h a una temperatura de 8 °C, obteniendo entre 65 a 70% de hidrólisis en cada una de las pruebas

realizadas. Posteriormente el producto ultrafiltrado e hidrolizado se concentró en un evaporador de cargas hasta una concentración de 25-32% de azúcares reductores. Estas pruebas preliminares se realizaron para comprender la relación existente entre la composición inicial de las mezclas de permeados y el efecto que tiene los procesos de ultrafiltración, hidrólisis de la lactosa y la concentración de sólidos por evaporación (100 °C durante 90 min) con respecto a la composición final del concentrado obtenido, en especial en el contenido de azúcares reductores y NaCl (Tabla 16).

Tabla 16. Mezclas realizadas de permeados de sueros dulces, dulces ácidos y dulces salados.

Mezcla	Tipo de permeado	% (v/v)	Azúcares reductores (%)	Cloruros (%)	NaCl (%)
1	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	80	30,40	1,22	-
	Dulce de queso Blanco fresco	20			
2	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	85	31,56	0,99	-
	Dulce de queso Blanco fresco	15			
3	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	60	15,00*	-	7,54
	Dulce ligeramente salado de queso Blanco	40			
4	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	60	10,00*	-	2,90
	Dulce de queso Blanco	25			
	Dulce ligeramente salado de queso Blanco	15			
5	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	80	10,10*	-	1,40
	Dulce de queso Blanco fresco	15			
	Dulce ligeramente salado de queso Blanco	5			
6	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	81,7	30,69		1,00
	Dulce de queso Blanco fresco	13,0			
	Dulce ligeramente salado de queso Blanco	5,3			
7	Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	78,4	29,82	-	2,00
	Dulce de queso Blanco fresco	10,6			
	Dulce ligeramente salado de queso Blanco	11,0			

*Mezclas de permeados sin hidrólisis de lactosa.

Para la producción del medio de fermentación sin adición de NaCl se utilizaron los permeados de sueros obtenidos en la elaboración de quesos sin adición de NaCl (permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y permeados de suero dulce de queso Blanco) en diferentes proporciones (80:20 y 85:15%) (Tabla 16, mezclas 1 y 2). La mezcla de 85% de permeado de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y 15% permeado de suero dulce de queso Blanco fue la más indicada para la obtención del medio de fermentación sin NaCl por su nivel más elevado presente en azúcares reductores, en comparación a la mezcla 80:20, y también porque la cantidad producida de permeados de sueros ligeramente ácidos de queso Mozzarella es mucho mayor en Pasteurizadora Táchira C.A. que la correspondiente a los permeados de sueros dulces de queso Blanco.

La Tabla 17 muestra el proceso de concentración de la mezcla de 85% de permeado de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y 15% permeado de suero dulce de queso Blanco, pudiéndose observar una disminución de pH (de 5,76 a 4,86) a los 90 min de proceso, y una concentración de los componentes del permeado, sobre todo efectiva a partir de los 30 min del proceso de concentración. Los resultados de esta mezcla son conformes a los requerimientos esperados al inicio de las pruebas de obtención del medio de fermentación. La mezcla de permeados una vez concentrado presentó un color amarillo ámbar, viscoso, pegajoso al tacto, sabor ligeramente dulce y salobre (Figura 22). El concentrado fue estable durante el almacenamiento, sin formación de cristales de lactosa por efecto de la hidrólisis realizada previamente con la enzima β -galactosidasa.

Tabla 17. Concentración en evaporador de la mezcla de 85% permeado de suero ligeramente ácido de queso Mozzarella y 15% de permeado de suero dulce de queso Blanco ultrafiltrada en membrana e hidrolizada.

Tiempo (min)	pH	Azúcares reductores (%)	Cloruros (%)
0	5,76±0,27	05,60±0,40	0,28±0,01
30	5,37±0,30	06,90±0,47	0,30±0,03
60	5,13±0,27	11,40±1,32	0,74±0,06
90	4,86±0,10	31,56±2,48	0,99±0,26

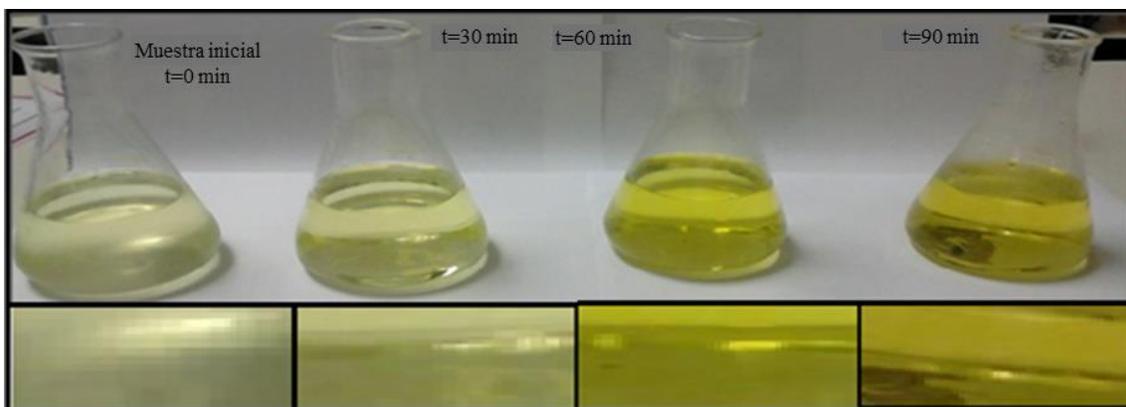


Figura 22. Aspecto visual del medio de fermentación durante el proceso de concentración por evaporación de la mezcla de 85% permeado de suero ligeramente ácido de queso Mozzarella y 15% de permeado de suero dulce de queso Blanco ultrafiltrada en membrana e hidrolizada, en diferentes intervalos de tiempo (0, 30, 60 y 90 min).

En la Tabla 18 se presenta los resultados de composición de 5 pruebas realizadas para obtener un medio de fermentación en ausencia de NaCl, obtenido a partir de las mezclas de permeado dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella (85%) y permeado dulce de queso Blanco (15%).

El pH obtenido durante la concentración de estos 2 tipos de permeados obtuvo un valor promedio de $4,86 \pm 0,10$. Das *et al.* (2016) estudiaron la producción de etanol utilizando permeados concentrados de suero de quesería, ajustando el pH a 4,50 como pH óptimo para la levadura *Kluyveromyces marxianus* NCIM[®] 3217TM. Ariyanti *et al.* (2013) trabajaron en la producción de etanol a partir de suero de quesería utilizando una cepa de *K. marxianus* obtenida de la colección del Centro de Biomasa y Energía Renovable de Indonesia y ajustando el pH entre 4,5 a 5,0 al suero utilizado durante la fermentación. Vincenzi *et al.* (2014) trabajaron en la producción de bioetanol a partir de suero de queso Ricotta utilizando las cepas ATCC[®]16045TM, ATCC[®]46537TM, ATCC[®]12424TM y CBS[®]6556TM de levadura *K. marxianus* donde el permeado de suero de quesería fue ajustado a un pH de 4,5 previo al inicio de la fermentación. Según Chaucheyras *et al.* (1997) la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se desarrolla bien en valores de pH entre 4,5 y 6,5. A este respecto, Lin *et al.* (2012) indicaron en su trabajo sobre factores que afectan la fermentación de etanol utilizando la levadura *S. cerevisiae* BY[®]472TM, que el pH óptimo de fermentación para la obtención de etanol es de 4-5.

Tabla 18. Composición de medio de fermentación en ausencia de NaCl.

Tipo de permeado	(%)	pH	Azúcares reductores (%)	Cloruros (%)
Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	85	4,86±0,10	31,56±2,48	0,99±0,26
Dulce de queso Blanco	15			

Por otra parte, durante la concentración de la mezcla de permeados sin adición de NaCl se obtuvo 31,56±2,48% de azúcares reductores, valores que corresponden a cantidades deseadas de sustrato para las pruebas de fermentación (Castellar *et al.*, 1998; Gökgöz *et al.*, 2013). La concentración inicial de azúcares es considerada como una fase importante en la producción de etanol. Una alta productividad y rendimiento en procesos de fermentación de etanol, puede ser obtenida usando altas concentraciones de azúcares. Sin embargo, es necesario largos tiempos de fermentación (Zabed *et al.*, 2014). En la mayoría de los trabajos consultados donde se utilizaron permeados concentrados de suero de quesería utilizando la levadura *K. marxianus*, se observa que las concentraciones de azúcares reductores varía entre 4 a 24%, considerando que una alta concentración de azúcares, afecta los procesos celulares de las levaduras, haciendo más lento el crecimiento celular, incrementando los tiempos de fermentación y obteniendo menos etanol por gramo de azúcar reductor (Grba *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2005; Ozhmici y Kargi, 2007c; Ariyanti *et al.*, 2013; Vicenzi *et al.*, 2014). Das *et al.* (2016) consideraron que un 20% de concentración de azúcares reductores en permeados concentrados de suero de quesería corresponde a un valor óptimo para la obtención de altos rendimientos de etanol utilizando la levadura *K. marxianus*. En el caso de la levadura *S. cerevisiae* es más resistente a altas concentraciones de azúcares reductores y etanol, y en los trabajos consultados donde se utilizó suero de quesería la concentración de azúcares reductores varió entre 10 y 20% (Guimarães *et al.*, 2008a; Guimarães *et al.*, 2008c).

Una vez establecido el medio de fermentación sin adición de NaCl, se abordó la formulación de medios de fermentación para obtener una concentración final de NaCl de 1 y 2% en los medios de fermentación. El objetivo de la obtención de medios de fermentación conteniendo NaCl al 1 y 2% fue el aprovechamiento de los permeados

ligeramente salados producidos por Pasteurizadora Táchira C.A. Para ello se formularon 3 mezclas conteniendo diferentes cantidades de permeado ligeramente salado de queso Blanco, en concreto 40, 25 y 5% (Tabla 16, mezclas 3, 4 y 5). Estas mezclas fueron sometidas a los mismos procesos de ultrafiltración y concentración que las anteriores descritas, y se obtuvieron los niveles de NaCl en los permeados concentrados. La determinación de NaCl se hizo a través de la cuantificación de cloruros teniendo en consideración la cantidad de cloruros presentes de manera habitual en los permeados sin adición de NaCl y que proceden directamente de la leche y de las adiciones directas realizadas de CaCl_2 durante la elaboración del queso. Los porcentajes obtenidos de NaCl en las diferentes mezclas ensayadas una vez concentradas (7,54; 2,90 y 1,40%), hizo que se pudiera calcular la proporción teórica de permeados ligeramente salados a introducir en las mezclas para poder obtener concentraciones de 1 y 2% NaCl en el producto concentrado final, que fueron de 5,32 y 11,01%, respectivamente (Tabla 16, mezclas 6 y 7). Así, en la obtención de un medio de fermentación con 1% NaCl se utilizó 81,63% de permeado dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella, 13,05% de permeado dulce de queso Blanco y 5,32% de permeado dulce ligeramente salado de queso Blanco para dar una concentración de 30,69% de azúcares reductores. En el medio de fermentación con 2% de NaCl se utilizó 78,35% de permeado dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella, 10,64% de permeado dulce de queso Blanco y 11,01% de permeado dulce ligeramente salado de queso Blanco, obteniendo una concentración de 29,82% de azúcares reductores.

En la Tabla 19 se presentan la composición promedio con su respectiva desviación estándar de 5 pruebas realizadas para obtener un medio de fermentación con 1% de NaCl. Los valores de pH se encuentran dentro de los valores óptimos de 4,5 a 5,0 descritos para el desarrollo de las levaduras, y los azúcares reductores dentro del intervalo óptimo de 25 a 32%. Con respecto al NaCl, se observa que una adición de 5,32% de permeado dulce ligeramente salado de queso Blanco a la mezcla, aporta la cantidad de NaCl requerida para alcanzar el 1% de NaCl en el medio de fermentación. Sin embargo, la desviación estándar obtenida en la concentración de NaCl en las diferentes pruebas de repetición realizadas fue elevada (>10%). Al revisar los trabajos realizados utilizando suero de quesería para la producción de etanol se evidencia que los sueros utilizados corresponden principalmente a sueros dulces y ácidos, debido a que el suero ligeramente salado de queso Blanco fresco es

obtenido generalmente en países de Centroamérica y Suramérica de la fabricación de quesos frescos tradicionales, y no se han conseguido trabajos donde se utilice este tipo de suero para la producción de etanol.

Tabla 19. Composición del medio de fermentación con 1% de NaCl.

Tipo de permeado	(%)	pH	Azúcares reductores (%)	NaCl (%)
Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	81,63			
Dulce de queso Blanco	13,05	4,93±0,15	30,69±1,35	1,00±0,11
Dulce ligeramente salado de queso Blanco	5,32			

En la Tabla 20 se presenta la composición promedio con su respectiva desviación estándar de 5 pruebas realizadas para obtener un medio de fermentación con 2% de NaCl. Los valores de pH obtenidos se encuentran dentro de los valores óptimos para el desarrollo de las levaduras, y el contenido de azúcares reductores también se sitúa dentro del intervalo óptimo requerido para el medio de fermentación con la finalidad de obtener una mayor cantidad de etanol por litro fermentado. Con respecto al NaCl, la adición de 10,64% de permeado dulce ligeramente salado de queso Blanco a la mezcla de permeados, permitió obtener un medio de fermentación con 2% de NaCl, obteniendo de nuevo una desviación estándar elevada (>10%).

Tabla 20. Composición del medio de fermentación con 2% de NaCl.

Tipo de permeado	(%)	pH	Azúcares reductores (%)	NaCl (%)
Dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella	78,35			
Dulce de queso Blanco	11,01	4,99±0,06	29,82±1,78	2,00±0,21
Dulce ligeramente salado de queso Blanco	10,64			

Si bien los resultados indican la posibilidad de utilizar diferentes cantidades de permeados de sueros ligeramente salados de queso Blanco de Pasteurizadora Tachira C.A. para obtener medios de fermentación con 1 y 2% de NaCl y utilizarlos en las pruebas de fermentación, la variabilidad existente en NaCl entre las diferentes repeticiones realizadas de las mezclas hizo replantear el trabajo. Con el objetivo de fijar la concentración de NaCl en el medio de fermentación evitando las variaciones de NaCl asociadas a la utilización de diferentes permeados ligeramente salados, se optó por la utilización del medio de fermentación sin NaCl (mezcla 2), al que una vez concentrado se le realizó una adición externa de NaCl para conseguir las concentraciones de 1 y 2% de NaCl.

4.2 USO DE PERMEADOS CONCENTRADOS DE SUERO DE QUESERÍA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl (0, 1 y 2%) COMO MEDIO DE FERMENTACIÓN POR LAS LEVADURAS *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* Y *Saccharomyces bayanus* EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL ETANOL

4.2.1 Ensayo preliminar de fermentaciones utilizando las levaduras *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* con diferentes concentraciones de NaCl

Diferentes autores han indicado la necesidad de la optimización de los procesos de fermentación en la obtención de etanol a partir de sueros y permeados de quesería, para lo cual es necesario el uso de levaduras resistentes a las condiciones del medio de fermentación y altas productoras de etanol (Guimarães *et al.*, 2010; Zabed *et al.*, 2014).

En este estudio, y con el objetivo de seleccionar las levaduras con mayor productividad de etanol, se realizó un experimento preliminar utilizando *K. marxianus* ATCC®36142™, *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®, y como medio de fermentación el seleccionado y producido por concentración de los permeados de sueros de quesería en ausencia o presencia de NaCl (1 y 2%), descritos en el apartado 4.1.3. En las Tablas 21, 22 y 23 se detallan los resultados de las pruebas de fermentación preliminares realizadas utilizando la levadura *K. marxianus* ATCC®36142™ en permeados concentrados procedentes de sueros de quesería con diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%).

En la Tabla 21 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de fermentación preliminares utilizando la levadura *K. marxianus* ATCC®36142™ en permeados concentrados procedentes de suero de quesería desproteinizados en ausencia de NaCl.

Los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación sin adición de NaCl tras el inóculo se situaron en 4×10^5 ufc/mL, valores que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación hasta niveles de 1×10^7 ufc/mL, manteniéndose este recuento en el quinto día de fermentación.

El pH del medio de fermentación sin adición de NaCl presentó una disminución de 0,09 unidades durante los 5 días de fermentación, descenso muy pequeño que podría estar asociado a la formación de compuestos ácidos de naturaleza orgánica durante la fermentación alcohólica (Enríquez & Acevedo, 2012). Sin embargo, dicha disminución de pH no hizo variar considerablemente el pH del medio de fermentación el cual se situó dentro de los valores óptimos para la levadura durante el proceso de fermentación, que según Hadiyanto *et al.* (2014) se encuentra entre 4,5 y 5,0. Vincenzi *et al.* (2014) trabajaron en la producción de bioetanol de suero de quesería utilizando varias cepas de *K. marxianus*, ajustando el pH a 4,5 como valor óptimo de desarrollo de la levadura.

Los resultados obtenidos mostraron un consumo lento pero continuo de azúcares reductores durante los 5 días de fermentación (consumo total de 74,5 g/L), obteniéndose $14,89 \pm 0,25$ g/L de etanol, y un valor teórico de 12,79 g/L de CO₂ calculado a partir del alcohol obtenido, para un total de 27,68 g/L de azúcares reductores consumidos en la producción de alcohol y un consumo de 46,82 g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. La cantidad de etanol obtenida al final de la fermentación ($14,89 \pm 0,25$ g/L), utilizando un permeado concentrado de suero desproteínizado sin adición de NaCl, representa una cantidad baja de etanol si se compara con los datos reportados por otros autores como Silveira *et al.* (2005) que obtuvieron 76-80 g/L de etanol utilizando la cepa *K. marxianus* ATCC®36142™ en un medio de fermentación compuesto por un permeado de suero con 17% de lactosa, y Kargi & Ozmihci (2006) que obtuvieron un rendimiento de 80 g/L de etanol, trabajando con una solución concentrada de suero en polvo con 15% de lactosa. Las cantidades de etanol obtenidas en el presente estudio son un 80% más bajas a las reportadas por otros autores, pudiendo ser un efecto de la alta concentración inicial de azúcares reductores presentes en el medio de fermentación, afectando la actividad de la membrana celular de esta levadura por estrés osmótico y por consiguiente la producción de etanol. Algunos autores han reportado un efecto inhibitorio durante la fermentación de sueros o concentrados de lactosa con cantidades mayores a 200 g/L debido a sensibilidad osmótica y baja tolerancia al etanol (Silveira *et al.*, 2005; Zafar *et al.*, 2005; Ozmihci & Kargi, 2007c).

La máxima productividad volumétrica de etanol fue obtenida en el primer día de fermentación ($0,15 \pm 0,02$ g/L h) para después disminuir y mantenerse constante durante el cuarto y quinto días de fermentación ($0,12 \pm 0,01$ g/L h), siendo baja con respecto a las obtenidas por Grba *et al.* (2002) que trabajando con *K. marxianus* en un medio de fermentación con 10% de lactosa obtuvieron 3,1 g/L h, y por Dinitz *et al.* (2014) que obtuvieron una productividad volumétrica de etanol de 0,49 g/L h utilizando *K. marxianus* UFV-3 en un medio de fermentación con una concentración de 20% de lactosa. Vincenzi *et al.* (2014) trabajando en la producción de bioetanol a partir de suero de quesería con 4,4% de lactosa y utilizando varias cepas de *K. marxianus*, mostraron la importancia en la elección de las cepas a utilizar, y obtuvieron una productividad

Tabla 21. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Kluyveromyces marxianus* ATCC® 36142™ utilizando permeados concentrados en ausencia de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,80±0,01	4,74±0,01	4,74±0,00	4,75±0,01	4,73±0,01	4,71±0,01
Azúcares reductores (g/L)	350,70±2,60	343,80±3,80	333,30±2,60	292,90±4,10	281,60±5,80	276,20±0,00
Etanol (g/L)	0,00±0,00	3,62±0,43	4,01±0,06	7,40±0,41	11,63±0,79	14,89±0,25
Q_p (g/L h)	-	0,15±0,02	0,08±0,00	0,10±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,54±0,16	0,23±0,00	0,13±0,01	0,17±0,02	0,20±0,00

volumétrica de $0,01 \pm 0,00$ g/L h con la cepa *K. marxianus* ATCC® 6556TM, siendo más baja que la productividad obtenida en las pruebas realizadas del presente trabajo, mientras que al utilizar la cepa *K. marxianus* ATCC® 16045TM alcanzaron, en las mismas condiciones de fermentación, una productividad volumétrica de 0,58 g/L h, mayor a la obtenida en el presente estudio.

El rendimiento de etanol por gramo de azúcares reductores consumidos fue de 0,20 g/g obtenido durante el quinto día de fermentación, siendo estos valores bajos con respecto al valor teórico de 0,538 g de etanol por gramo de azúcares reductores fermentables (Koushki *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados obtenidos son mejores a los reportados por Vincenzi *et al.* (2014) que trabajando con la cepa *K. marxianus* ATCC® 6556TM en la producción de bioetanol a partir de un suero de quesería con 4,4% de lactosa, obtuvieron un rendimiento de etanol de $0,02 \pm 0,00$ g/g lactosa, y similares a los encontrados por Ariyanti *et al.* (2013) con la cepa *K. marxianus* CBRE en un medio de fermentación con 4,6% de lactosa obteniendo un rendimiento de etanol de 0,213 g/g lactosa, así como los reportados por Hadiyanto *et al.* (2014) con una cepa de *K. marxianus* en un medio de fermentación con 4,8% de lactosa, obteniendo un rendimiento de etanol de 0,21 g/g de lactosa. En el caso de otros autores como Araujo *et al.* (2015), los rendimientos de etanol hallados fueron mayores en comparación al del presente estudio, ya que trabajando con la cepa *K. marxianus* ATCC® 8554TM en un medio de fermentación con 10% de lactosa, alcanzaron un rendimiento de etanol de 0,38 g/g de lactosa.

En la Tabla 22 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de fermentación preliminares utilizando la levadura *K. marxianus* ATCC® 36142TM en permeados concentrados procedentes de suero de quesería desproteinizados conteniendo 1% de NaCl. En este caso el pH del medio de fermentación presentó una disminución de 0,13 unidades durante los 5 días de ensayo, valores que son prácticamente similares a los obtenidos en las pruebas de fermentación realizadas sin adición de NaCl. Sin embargo, la cantidad de etanol obtenida en el medio de fermentación adicionado de 1% NaCl fue de $1,94 \pm 0,01$ g/L, presentando una reducción del 86,97% en comparación de la cantidad de etanol obtenida en las pruebas sin adición de NaCl.

Tabla 22. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Kluyveromyces marxianus* ATCC® 36142™ utilizando permeados concentrados adicionados de 1% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,84±0,01	4,79±0,00	4,74±0,01	4,69±0,00	4,73±0,01	4,71±0,01
Azúcares reductores (g/L)	304,50±1,10	287,30±8,00	281,50±0,00	268,60±7,00	267,20±3,50	267,10±5,60
Etanol (g/L)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,80±0,01	0,60±0,01	0,62±0,01	1,94±0,01
Q_p (g/L h)	-	0,00±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,00±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00

Esta reducción en la producción de etanol podría estar relacionada con la cantidad de NaCl presente en el permeado concentrado y al efecto de los iones de Na⁺ sobre la actividad de algunas enzimas, generando inhibición enzimática y afectando los procesos metabólicos en la membrana celular de la levadura (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Durante el proceso de fermentación se consumieron 37,4 g/L de azúcares reductores desde el inicio de la fermentación para la producción de 1,94±0,01g/L de etanol, lo que indica un valor teórico de 1,67 g/L de CO₂ calculado a partir del alcohol obtenido, para un total de 3,61 g/L de azúcares reductores consumidos para la producción del alcohol y un consumo de 33,79 g/L de azúcares reductores en la producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. Al comparar los resultados de azúcares consumidos en el medio de fermentación con 1% de NaCl, se observa una reducción del 49,80% respecto a los procesos de fermentación llevados a cabo sin adición de NaCl.

Utilizando el medio de fermentación adicionado de 1% de NaCl se obtuvo una productividad de etanol de 0,02 g/L h y un rendimiento de etanol de 0,05 g/g, lo cual representa una disminución en los valores de estos parámetros cinéticos del 83,33 y 75%, respectivamente con respecto a las pruebas realizadas sin adición de NaCl, indicando que la presencia de 1% de NaCl afecta largamente el proceso fermentativo mediado por *K. marxianus* ATCC® 36142TM en la producción de etanol.

En la Tabla 23 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de fermentación preliminares utilizando la levadura *K. marxianus* ATCC® 36142TM en permeados concentrados procedentes de suero quesería desproteinizados conteniendo 2% de NaCl.

La presencia de 2% NaCl en el medio de fermentación no hizo variar de manera considerable la evolución de pH del medio durante el periodo fermentativo, presentando una disminución de 0,14 unidades, variación similar a la experimentada en los medios de fermentación en ausencia o presencia del 1% de NaCl.

Al quinto día de fermentación la cantidad de etanol obtenida fue de 1,16±0,09 g/L, concentración que disminuyó en un 92,21% al compararla con la obtenida sin adición de NaCl, indicando que la presencia de 2% de NaCl en el medio de fermentación afecta negativamente el metabolismo celular de las levaduras y por consiguiente la producción de etanol, y que un incremento en la cantidad de NaCl (de 1 a 2%) en el medio de

fermentación produce una disminución adicional de 40,21% en la concentración de etanol. Para obtener esta cantidad de etanol se consumieron 21,9 g de azúcares reductores, de los cuales y por cálculo teórico un total de 2,14 g/L de azúcares reductores fueron para la producción de alcohol y el restante 19,76 g/L de los azúcares reductores fueron utilizados en la producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. Al comparar el consumo de los azúcares reductores con respecto a los procesos fermentativos llevados a cabo sin adición de NaCl, se evidencia una disminución del 70,6% en el consumo de azúcares reductores, y un 41,44% adicional si lo comparamos con el medio de fermentación con 1% de NaCl.

La productividad máxima de etanol se inició al día 2 del proceso de fermentación con valores de $0,02 \pm 0,00$ g/L h para después disminuir en los días siguientes, indicando que la producción de etanol fue casi por completo inhibida al utilizar el medio de fermentación conteniendo 2% de NaCl.

El rendimiento de etanol máximo obtenido en el proceso fermentativo expresado por azúcares reductores consumidos fue de $0,05 \pm 0,00$ g/g, valor que se obtuvo a partir del tercer día de fermentación y que se mantuvo hasta el quinto día, siendo este igual al obtenido en el medio de fermentación con 1% de NaCl.

En la Figura 23 se presentan los resultados preliminares comparativos de producción de etanol según la concentración de NaCl para las diferentes levaduras objeto de este estudio, realizado en un experimento utilizando 2 réplicas para cada levadura y concentración de NaCl. De las tres levaduras evaluadas, *S. cerevisiae* fue con la que se obtuvo la mayor cantidad de etanol y mejor comportamiento de los parámetros cinéticos, seguida de *S. bayanus*, y *K. marxianus* que correspondió a la levadura y proceso fermentativo donde se obtuvo el menor rendimiento de etanol, por un bajo consumo de azúcares reductores presentando así los valores más bajos en los parámetros cinéticos estudiados.

De las tres concentraciones de NaCl utilizadas (0, 1 y 2%) para evaluar la capacidad de fermentación de la levadura *K. marxianus*, el medio de fermentación sin adición de NaCl fue el que presentó los mejores rendimientos con respecto a los medios conteniendo concentraciones de 1 y 2% de NaCl.

Tabla 23. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Kluyveromyces marxianus* ATCC® 36142™ utilizando permeados concentrados adicionados de 2% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,84±0,01	4,81±0,00	4,77±0,01	4,71±0,00	4,70±0,01	4,70±0,01
Azúcares reductores (g/L)	304,50±1,10	294,40±3,70	291,00±1,50	284,50±4,10	282,70±2,60	282,60±1,60
Etanol (g/L)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,51±0,13	0,89±0,07	1,03±0,11	1,16±0,09
Q_p (g/L h)	-	0,00±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,00±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00

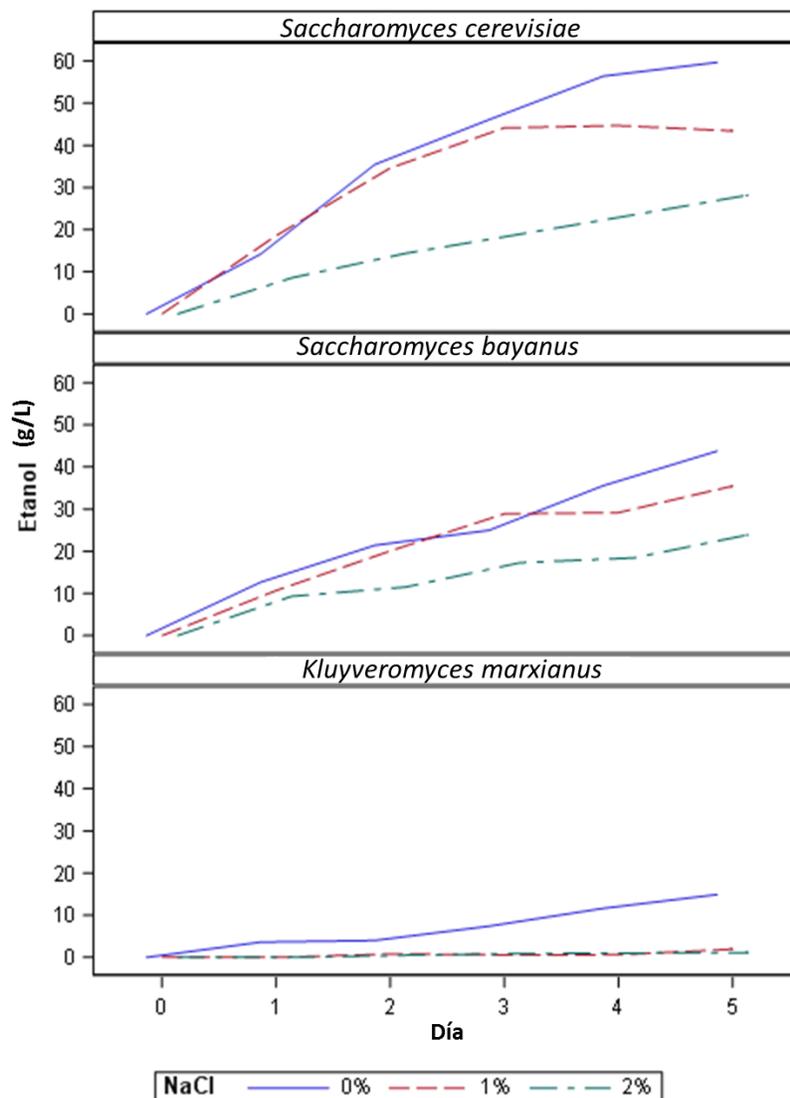


Figura 23. Efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) sobre la producción de etanol utilizando las levaduras *K. marxianus* ATCC® 36142™, *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

Los resultados obtenidos en este experimento preliminar mostraron que la levadura *K. marxianus* ATCC®36142™ produce cantidades muy limitadas de etanol en comparación a *S. cerevisiae* y *S. bayanus* a partir del medio de fermentación utilizado y en las condiciones establecidas de fermentación. Son diversos los autores que han indicado efectos inhibitorios y problemas asociados en la fermentación de medios concentrados de lactosa o de sueros/permeados de quesería, produciéndose fermentaciones lentas y altos contenidos de azúcares residuales cuando la concentración inicial de lactosa aumenta por encima de 100

g/L, siendo esta levadura generalmente inefectiva en medios de fermentación con concentraciones de lactosa por encima de 200 g/L (Gawel y Kosikowski, 1978; Dale *et al.*, 1994; Silveira *et al.*, 2005; Zafar *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2010). Estos problemas se han atribuido comúnmente a la alta sensibilidad osmótica (debido a las altas concentraciones de lactosa) y a la baja tolerancia al etanol (Vienne & Von Stockar, 1985; Zafar *et al.*, 2005), así como a la inhibición de esta levadura por la alta concentración de sales encontradas en los medios de fermentación obtenidos por concentración (Grubb & Mawson, 1993).

Sin embargo, y según se describe en la literatura estos efectos parecen ser cepa dependiente, y la implementación de sistemas de fermentación de lotes alimentados podría ayudar a evitar los problemas de inhibición por sustrato (lactosa y sales) (Ozmihci & Kargi, 2007a) y la inhibición por etanol podría mejorarse con la suplementación nutricional del medio de fermentación (Janssens *et al.*, 1983).

Por otra parte, en este estudio se ha puesto de manifiesto que *K. marxianus* ATCC®36142™ es muy afectada por concentraciones de NaCl al 1% (170 mM) inhibiendo casi por completo sus procesos metabólicos en concentrados de permeados conteniendo 2% de NaCl (340 mM). Serrano (1996) en su estudio indicó que concentraciones entre 300 y 500 mM de NaCl en medios de fermentación inhiben las reacciones metabólicas, ya que perturban el balance hidrófobo-electrostático, afectando el funcionamiento proteico de la levadura. Ozmihci & Kargi (2007d) indicaron que altas concentraciones de NaCl y suplementos nutricionales afectan la actividad de la membrana celular por estrés osmótico y por consiguiente el desarrollo de la levadura *K. marxianus*.

En base a los bajos rendimientos obtenidos en las pruebas realizadas con *K. marxianus* ATCC® 36142™ se decidió continuar el estudio de las pruebas de fermentación con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, ya que en el experimento preliminar se obtuvieron mejores rendimientos de etanol.

4.2.2 Procesos de fermentación utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® con diferentes concentraciones de NaCl

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras más utilizadas en la producción de etanol por su alta capacidad fermentativa, tolerancia hasta concentraciones de 20% de etanol,

rápido crecimiento bajo condiciones anaeróbicas, por lo cual ha sido utilizada por otros autores en la producción de etanol a partir derivados de sueros o permeados de quesería (Antoni *et al.*, 2007; Cot *et al.*, 2007).

En las Tablas 24, 25 y 26 se detallan los resultados obtenidos en las 3 pruebas de fermentación realizadas de manera independiente con dos réplicas cada una utilizando la levadura *S. cerevisiae* marca Levapan® en permeados concentrados procedente de sueros de quesería en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de NaCl (1 y 2%). Durante las pruebas preliminares realizadas con la levadura *S. cerevisiae*, los resultados indicaron que es la más resistente a altas concentraciones de azúcares reductores y de etanol en las pruebas de fermentación realizadas con diferentes concentraciones de NaCl en permeados concentrados.

En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación realizadas utilizando la levadura *S. cerevisiae* marca Levapan® en permeados en ausencia de NaCl.

En los experimentos realizados sin adición de NaCl, los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación tras el inóculo de *S. cerevisiae* se situaron en 1×10^5 ufc/mL, recuentos que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación hasta niveles de 1×10^6 ufc/mL, para disminuir al día quinto de fermentación a 3×10^4 ufc/mL. Entre las tensiones ambientales que sufren las levaduras, el etanol constituye el principal factor de estrés durante los procesos de fermentación. Desde un punto de vista fisiológico, el etanol inhibe el crecimiento y la viabilidad de las levaduras, afecta a diferentes sistemas de transporte, como el sistema general de transporte de aminoácidos y la captación de glucosa, e inhibe la actividad de las principales enzimas glucolíticas. El efecto principal del etanol se produce sobre la membrana plasmática de la levadura, cuya fluidez se altera durante el estrés por etanol. Esta alteración produce cambios en la permeabilidad de las especies iónicas, especialmente de los protones. El aumento de la entrada de protones da como resultado la rápida disipación del gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática y la posterior acidificación intracelular (Alexandre *et al.*, 2001).

Tabla 24. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® utilizando permeados concentrados procedentes de sueros de quesería desproteinizados en ausencia de NaCl.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,96±0,14	4,83±0,20	4,76±0,21	4,72±0,17	4,62±0,18	4,56±0,16
Azúcares reductores (g/L)	275,63±30,80 ^a	245,12±36,74 ^{ab}	219,38±25,73 ^{abc}	186,55±6,07 ^{bc}	181,00±10,77 ^{cd}	164,73±4,69 ^d
Etanol (g/L)	0,00±0,00 ^d	12,63±1,38 ^c	28,17±7,76 ^{bc}	35,12±10,00 ^{ab}	44,10±10,89 ^{ab}	50,86±9,34 ^a
Q_p (g/L h)	-	0,53±0,06	0,59±0,16	0,49±0,14	0,46±0,11	0,42±0,08
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,45±0,08	0,50±0,10	0,40±0,07	0,48±0,08	0,47±0,05

^{abcd} Medias en la misma fila para cada uno de los parámetros estudiados con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

El pH del medio sin adición de NaCl presentó una disminución durante los 5 días de fermentación de 0,40 unidades, disminución que no fue significativa ($p \geq 0,05$) y que podría estar asociada a la formación de pequeñas concentraciones de coproductos de naturaleza ácida durante la fermentación (Zi *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016a).

La cantidad obtenida de etanol al quinto día de fermentación con este medio fue de $50,86 \pm 9,34$ g/L, observándose un incremento durante el tiempo de fermentación con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), en concreto entre el día 0 y los días 2, 3, 4 y 5, y entre el día 1 y los días 3, 4 y 5. Esta cantidad de etanol supone un 70,7% más que el producido en similares condiciones por *K. marxianus* ATCC® 36142™.

Para la producción de los $50,86 \pm 9,34$ g/L de etanol se consumieron un total de 110,90 g/L de azúcares reductores desde el inicio de la fermentación, obteniéndose un valor teórico de 43,68 g/L de CO₂ para un total de 94,54 g/L de azúcares reductores teóricos consumidos en la producción de alcohol, y así un consumo teórico de 16,36 g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. La concentración en azúcares reductores disminuyó durante el tiempo de fermentación observándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los días 0 y 1, y los días 3, 4 y 5. Guimarães *et al.* (2008a) estudiaron la evolución en la adaptación del consumo de lactosa de *S. cerevisiae* recombinante expresando *L. lactis* LAC4 y LAC12 utilizando una solución concentrada de suero en polvo con 15% de lactosa y obteniendo 55 g/L de etanol, valor similar aunque ligeramente superior al obtenido en la presente investigación.

La mayor y menor productividades de etanol obtenidas en estas condiciones fue de $0,59 \pm 0,16$ y $0,42 \pm 0,08$ g/L h, y se localizaron en el segundo y quinto día de fermentación, respectivamente indicando que *S. cerevisiae* es buena productora de etanol en un concentrado de permeado de suero de quesería sin adición de NaCl. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en productividad de etanol, la cual se mantuvo estable en los diferentes días de fermentación.

El mejor rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos fue de $0,50 \pm 0,10$ g/g obtenido durante el segundo día de fermentación, siendo este valor al final de la fermentación (quinto día) de $0,47 \pm 0,05$ g/g de azúcares reductores, pasando por un mínimo

de 0,40 al tercer día de fermentación, rendimientos cercanos al valor teórico de etanol de 0,538 g/g. Tampoco en este caso se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) para este parámetro entre los días de fermentación.

Domingues *et al.* (2002) utilizando un bioreactor continuo de 6 L y un medio semi-sintético con 5% de lactosa y la levadura *S. cerevisiae* expresando β -galactosidasa de *Aspergillus niger* obtuvieron una productividad de etanol de 9 g/L h, siendo una productividad mucho mayor a la reportada en las pruebas realizadas. Estos valores más elevados pueden explicarse por la utilización por parte de estos autores de un proceso de fermentación continuo, ya que se obtienen mayores volúmenes de etanol con respecto a los sistemas discontinuos, permitiendo trabajar con concentraciones bajas de sustrato que no producen inhibición sobre las levaduras, favoreciendo los procesos metabólicos celulares y la fermentación. Guimarães *et al.* (2008a) trabajaron en la producción de etanol utilizando un bioreactor por proceso discontinuo como el utilizado en las pruebas realizadas en esta tesis, con una solución concentrada elaborada a partir de suero en polvo con 15% de lactosa y una cepa de *S. cerevisiae* expresando el gen LAC4 y LAC12 de *K. lactis* obteniéndose un proceso de fermentación mucho más lento y una productividad de etanol de 0,46 g/L h mucho más baja, en comparación al estudio anteriormente comentado, por efecto de la inhibición producida por la concentración de sustrato sobre los procesos metabólicos de la levadura, siendo las condiciones de proceso y los resultados de productividad obtenidos muy similares a los de la presente investigación.

Domingues *et al.* (1999) utilizando una cepa de *S. cerevisiae* expresando el gen *LAC4* (codificado para producir β -galactosidasa) y *LAC12* (codificado para producir lactosa permeasa) de *K. lactis*, y una solución con 5% de lactosa para producir etanol en un proceso de operación continua, obtuvieron un alto rendimiento de etanol de 0,51 g/g, generando nuevas perspectivas en el desarrollo a gran escala de procesos económicamente factibles de producción de etanol a partir de suero de quesería. Los resultados mostrados son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación adicionado de 1% NaCl tras el inóculo de *S. cerevisiae* se situaron en 1×10^5 ufc/mL, recuentos que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación hasta niveles de 2×10^7

ufc/mL, para disminuir al día quinto de fermentación a 6×10^5 ufc/mL. En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación realizadas utilizando la levadura *S. cerevisiae* marca Levapan en permeados concentrados con 1% de NaCl.

En las pruebas realizadas con medio de fermentación adicionado de 1% de NaCl, el pH presentó una disminución de 0,39 unidades durante los 5 días de fermentación, siendo similar al obtenido en las pruebas sin NaCl añadido, observándose una disminución progresiva del pH durante los 5 días de análisis, aunque solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 0 con respecto al día 5 de fermentación.

La cantidad máxima obtenida de etanol fue de $40,93 \pm 3,71$ g/L al final del quinto día de fermentación, observándose un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en la producción de etanol entre inicio y la finalización del proceso fermentativo (día 5), en concreto entre los días 0 y 1 y los días 3, 4 y 5.

Para obtener los $40,93 \pm 3,71$ g/L de etanol se consumieron un total de 93,74 g/L de azúcares reductores desde el inicio de la fermentación, produciéndose a nivel teórico 35,15 g/L de CO₂ para un total de 76,08 g/L de azúcares reductores consumidos para la producción de alcohol y un consumo de 16,51 g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación, observándose una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de los azúcares reductores al inicio (día 0) y los días 2, 3, 4 y 5, y entre el día 1 y los días 4 y 5.

Utilizando el medio de fermentación adicionado de 1% NaCl, la mayor productividad volumétrica en la producción de etanol se obtuvo durante los días 1 y 2 ($0,64 \pm 0,14$ g/L h), la cual tendió a disminuir hasta alcanzar el quinto día de fermentación donde se obtuvo el valor más bajo ($0,34 \pm 0,03$ g/L h). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en productividad de etanol entre los diferentes días de fermentación, al igual que ocurrió al utilizar el medio de fermentación sin adición de NaCl. El máximo rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) se obtuvo en el primer día de fermentación, aunque los valores obtenidos durante los 5 días de fermentación fueron similares ($p \geq 0,05$), presentando en el resto de días de fermentación un rendimiento de etanol de $\sim 0,45$ g/g de azúcares reductores.

Tabla 25. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® utilizando permeados concentrados con 1% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,96±0,13 ^a	4,79±0,14 ^{ab}	4,74±0,13 ^{ab}	4,71±0,12 ^{ab}	4,65±0,13 ^{ab}	4,57±0,15 ^b
Azúcares reductores (g/L)	274,72±29,75 ^a	242,07±27,26 ^{ab}	212,97±17,29 ^{bc}	192,32±4,56 ^{bc}	186,27±10,48 ^c	180,98±14,14 ^c
Etanol (g/L)	0,00±0,00 ^c	15,40±3,41 ^b	27,63±8,07 ^{ab}	35,65±9,65 ^a	39,44±6,81 ^a	40,93±3,71 ^a
Q_p (g/L h)	-	0,64±0,14	0,58±0,17	0,50±0,13	0,41±0,07	0,34±0,03
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,47±0,07	0,45±0,04	0,44±0,03	0,45±0,03	0,44±0,04

^{abc} Medias en la misma fila para cada uno de los parámetros estudiados con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación realizada utilizando la levadura *S. cerevisiae* en permeados concentrados con 2% de NaCl.

Los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación adicionado de 2% NaCl tras el inóculo de *S. cerevisiae* se situaron en 1×10^5 ufc/mL, recuentos que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación, para disminuir al día quinto de fermentación de manera similar a como lo hizo en el medio de fermentación adicionado de 1% NaCl.

El pH del medio de fermentación conteniendo 2% NaCl presentó una disminución de 0,40 unidades al final del quinto día de fermentación, valores similares a los obtenidos en las pruebas realizadas en los medios de fermentación sin y con 1% de NaCl, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 0 con respecto a los otros días de fermentación, y entre el día 1 con respecto al día 5.

La cantidad de etanol obtenida aumentó progresivamente a lo largo del tiempo, encontrándose la concentración máxima ($23,93 \pm 4,02$ g/L) al final de la fermentación (día 5), si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) para este parámetro desde el día 3.

Con este medio de fermentación, y durante los 5 días de análisis, se consumieron un total de 73,9 g/L de azúcares reductores, produciéndose $23,93 \pm 4,02$ g/L de etanol y un valor teórico de 20,55 g/L de CO₂ para un total teórico de 44,48 g/L de azúcares reductores consumidos para la producción de alcohol y un consumo de 29,42 g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 0 con respecto a los días 4 y 5 de fermentación.

Con este medio, la mayor productividad volumétrica de etanol se obtuvo en el día 1, y disminuyó progresivamente durante el periodo de fermentación, observándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) únicamente entre los días 1 y 5.

Tabla 26. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® utilizando permeados concentrados con 2% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	5,04±0,00 ^a	4,84±0,01 ^b	4,76±0,05 ^{bc}	4,69±0,08 ^{bc}	4,67±0,09 ^{bc}	4,64±0,11 ^c
Azúcares reductores (g/L)	256,07±26,27 ^a	241,45±21,06 ^{ab}	223,12±20,87 ^{ab}	203,28±20,69 ^{ab}	193,58±21,31 ^b	182,17±22,14 ^b
Etanol (g/L)	0,00±0,00 ^d	8,03±1,76 ^c	14,56±2,76 ^{bc}	18,40±1,76 ^{ab}	21,27±2,05 ^a	23,93±4,02 ^a
Q_p (g/L h)	-	0,33±0,07 ^a	0,30±0,06 ^{ab}	0,26±0,02 ^{ab}	0,22±0,03 ^{ab}	0,20±0,03 ^b
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,58±0,10 ^a	0,38±0,11 ^b	0,35±0,01 ^b	0,34±0,05 ^b	0,33±0,03 ^b

^{abcd} Medias en la misma fila para cada uno de los parámetros estudiados con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

El máximo rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos en el medio adicionado de 2% de NaCl se obtuvo en el primer día de fermentación, disminuyendo de manera significativa ($p \leq 0,05$) al día 2, para después estabilizarse en valores de 0,38-0,33 g/g.

La Tabla 27 muestra el efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores a partir de medios de fermentación sin y con la inclusión de NaCl (1 y 2%) utilizando la levadura *S. cerevisiae*.

La cantidad máxima de etanol producido al día 5 a partir del medio de fermentación adicionado de 1% NaCl fue un 19,5% menor con respecto a las pruebas realizadas con el medio de fermentación sin adición de NaCl, sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($p \geq 0,05$). Cuando el medio de fermentación utilizado contuvo 2% de NaCl la concentración de etanol disminuyó un 52,95% con respecto a las pruebas realizadas con medio de fermentación sin adición de NaCl, y un 41,53% con respecto a las pruebas con medio de fermentación adicionado de 1% de NaCl. Los resultados obtenidos en los tres medios de fermentación con diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%) indican que solo la presencia de un 2% de NaCl en el medio de fermentación y en las condiciones ensayadas afecta el metabolismo celular de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada, y por consiguiente, la producción de etanol.

Tabla 27. Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan®.

NaCl (%)	Azúcares reductores (g/L)		Etanol (g/L)	
	Día		Día	
	(0-5)*	1	5	
0	110,90±24,72 ^a	12,63±1,63 ^{ab}	50,86±9,34 ^a	
1	93,73±15,65 ^{ab}	15,40±3,41 ^a	40,93±3,71 ^a	
2	73,90±11,03 ^b	8,03±1,76 ^b	23,93±1,69 ^b	

*Azúcares consumidos por la levadura durante el periodo de fermentación (5 días).

^{abc} Medias en la misma columna para cada uno de los días y parámetros con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

Los resultados también muestran una disminución del 15,48% en el consumo de azúcares reductores utilizando el medio de fermentación adicionado de 1% NaCl con respecto a las pruebas realizadas en el permeado concentrado de sueros sin la adición de NaCl. No obstante, y pese a observarse una tendencia en la reducción de azúcares, no es posible concluir con un nivel de significación del 5% que la concentración de 1% NaCl tuvo un efecto en la reducción de la diferencia de azúcares entre el día 0 y el día 5, en comparación a los permeados de suero sin adición de NaCl. Sin embargo, cuando el medio de fermentación fue adicionado del 2% NaCl, y al compararlo con las pruebas realizadas sin adición de NaCl se observó que la levadura consumió 33,36% menos de azúcares reductores, y un 21,16% menos cuando el medio contuvo 1% de NaCl, disminuciones que fueron solo significativas ($p \leq 0,05$) al comparar el medio sin NaCl adicionado y el añadido del 2% de NaCl.

En la Tabla 28 se presenta un resumen de la productividad de etanol (Q_p) y rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) a partir de medios de fermentación sin y con la inclusión de NaCl (1 y 2%) utilizando la levadura *S. cerevisiae*, para los días 1 y 5 de fermentación.

Tabla 28. Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan®.

NaCl (%)	Q_p (g/L h)		$Y_{E/S}$ (g/g)	
	Día		Día	
	1	5	1	5
0	0,53±0,06 ^a	0,42±0,08 ^a	0,45±0,08 ^a	0,47±0,05 ^a
1	0,64±0,14 ^{ab}	0,34±0,03 ^a	0,47±0,07 ^a	0,44±0,04 ^a
2	0,33±0,07 ^b	0,20±0,03 ^b	0,58±0,10 ^a	0,33±0,03 ^b

^{abc} Medias en la misma columna para cada uno de los días y parámetros cinéticos con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

Al comparar los valores obtenidos en productividad volumétrica en los días 1 y 5 de fermentación entre los medios de fermentación sin y con adición del 1% NaCl, no se pudo evidenciar diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$), aunque en el día 5 de

fermentación utilizando el medio conteniendo 1% NaCl se observara una disminución del 19,05%. Cuando el medio de fermentación fue añadido de 2% de NaCl se pudo calcular una disminución en la productividad volumétrica en los días 1 y 5 de fermentación del 37,74 y 52,38%, respectivamente en relación a las pruebas realizadas con el medio sin adición de NaCl, y del 48,44 y 41,18%, respectivamente en relación a los ensayos realizados con el medio adicionado de 1% de NaCl. Sin embargo, estas diferencias solo fueron significativas ($p \leq 0,05$) a los días 1 y 5 cuando el medio utilizado fue el añadido del 2% de NaCl respecto del no adicionado de NaCl. Moon *et al.* (2010) indicaron que la captación de sustrato y el crecimiento celular de *S. cerevisiae* en un medio rico en glucosa disminuye drásticamente con valores de 4% de NaCl, afectando la productividad volumétrica de etanol obtenida durante la fermentación, así como un incremento en los tiempos de fermentación al influir negativamente en el metabolismo celular. Resultados similares los obtuvo Modig *et al.* (2007) que, trabajando con *S. cerevisiae* en un medio de fermentación con una concentración de 40 g/L de NaCl bajo condiciones anaeróbicas, observaron un incremento en el tiempo necesario para la conversión completa de la glucosa y disminución de las tasas de crecimiento específicas entre un 80-90% cuando las células se sometieron a condiciones hiperosmóticas.

Al considerarse el rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) se pudo observar una disminución no significativa en los rendimientos del 6,38% en las pruebas realizadas con 1% de NaCl respecto del medio sin adición del NaCl. Cuando el medio utilizado fue el añadido del 2% de NaCl, se observaron disminuciones del 29,79 y 25% con respecto a las pruebas realizadas en ausencia o presencia de 1% de NaCl, respectivamente. Al igual que sucedió para el parámetro cinético de productividad volumétrica de etanol, estas disminuciones fueron solo significativas ($p \leq 0,05$) al comparar los medios de fermentación sin adición de NaCl con el añadido del 2% de NaCl. Oda & Tonomura (1993) en su trabajo sobre el efecto del NaCl y el potencial fermentativo de *S. cerevisiae* en panificación, indicaron que la capacidad de fermentación y el crecimiento celular de las levaduras de panadería disminuye drásticamente en la medida que incrementa las concentraciones de NaCl entre 0 y 3%. En el presente estudio y a medida que se incrementó la concentración de NaCl, se pudo observar una reducción en la producción de etanol y rendimientos, hecho que está relacionado con la inhibición, por la concentración de

NaCl, de algunas enzimas producidas por la levadura *S. cerevisiae* que son especialmente sensibles a la inhibición causada por los iones Na^+ o Cl^- , aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, probablemente debido a la interacción específica de los iones con sitios importantes de la proteína (Folch-Mallol *et al.*, 2004), afectando los procesos metabólicos y provocando una disminución o inhibición del metabolismo celular como se ha evidenciado en las pruebas realizadas. Ma *et al.* (2016a) también han reportado que el ion Na^+ puede producir toxicidad en los microorganismos e influenciar negativamente la producción de etanol durante la fermentación.

4.2.3 Procesos de fermentación utilizando la levadura *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity® con diferentes concentraciones de NaCl

Saccharomyces bayanus marca Fermiline Tipicity® es una levadura muy utilizada en la elaboración de cerveza tipo *lager* y en vinos que presentan retardo durante su fermentación (fermentaciones tardías), con muy buena capacidad fermentativa bajo condiciones anaeróbicas, soportando altas concentraciones de etanol; sin embargo, esta levadura ha sido poco utilizada en la fermentación de permeados de suero de quesería.

Los resultados globales muestran que al incrementar la concentración de NaCl en el medio de fermentación se obtuvo una reducción en la cantidad de etanol producido y un descenso en los valores de los parámetros cinéticos tal y como se pudo también observar en las pruebas realizadas con *S. cerevisiae* marca Levapan® y a los obtenidos en las pruebas preliminares realizadas con la levadura *K. marxianus* ATCC® 36142™.

En la Tabla 29 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación realizadas con dos réplicas y en dos ocasiones independientes utilizando la levadura *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity® en permeados concentrados sin adición de NaCl.

Los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación sin adición de NaCl tras el inóculo de *S. bayanus* se situaron en 1×10^5 ufc/mL, valores que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación hasta niveles de 7×10^6 ufc/mL, para disminuir al día quinto de fermentación a 1×10^6 ufc/mL.

Tabla 29. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity® utilizando permeados concentrados procedentes de sueros de quesería desproteinizados en ausencia de NaCl.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,91±0,17	4,87±0,13	4,84±0,12	4,83±0,12	4,82±0,11	4,81±0,10
Azúcares reductores (g/L)	280,49±9,51 ^a	242,45±27,93 ^{ab}	228,33±30,09 ^{ab}	209,98±14,04 ^{ab}	197,98±6,37 ^b	169,88±14,74 ^b
Etanol (g/L)	0,00±0,00 ^d	11,93±1,17 ^c	18,72±2,71 ^{bc}	24,86±0,89 ^b	35,37±4,60 ^a	41,27±2,50 ^a
Q_p (g/L h)	-	0,50±0,05 ^a	0,39±0,06 ^{ab}	0,35±0,01 ^b	0,37±0,05 ^b	0,34±0,02 ^b
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,42±0,19	0,45±0,19	0,34±0,03	0,40±0,08	0,35±0,02

^{abcde} Medias en la misma fila para cada uno de los parámetros estudiados con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

El pH del medio presentó una pequeña disminución de 0,10 unidades al final de la fermentación, posiblemente asociada a la producción de coproductos durante el proceso mediado por *S. bayanus* (Mesas & Alegre, 2009), no observándose diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en el pH de los permeados entre el día 0 y el resto de días de fermentación. Gökgöz & Yiğitoğlu (2013) trabajaron con células inmovilizadas de *S. bayanus* en carboximetilcelulosa- γ -poli(N-vinil-2-pirrolidona) en un medio de fermentación con 200 g/L de glucosa ajustado a pH de 5,0 e indicaron que el intervalo óptimo de pH de *S. bayanus* es 4,5-5,0 ya que valores inferiores a 4,5 afectan la capacidad de la levadura para convertir los azúcares en etanol (Liu & Shen, 2008; Zhao & Xia, 2010).

La cantidad obtenida de etanol al quinto día de la fermentación con este medio (sin adición de NaCl) fue de $41,27 \pm 2,50$ g/L, observándose un incremento durante el tiempo de fermentación con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes días, en concreto entre el día 1 y los días 3, 4 y 5, y entre el día 3 y los días 4 y 5. Esta cantidad de etanol producido supone un 63,9% más que el producido en similares condiciones por *K. marxianus* ATCC® 36142™ y un 17,64% menos de etanol que el producido por *Saccharomyces cerevisiae*. Castellar *et al.* (1998) estudiaron el efecto de la adición de zeolita (5 g/L) en la producción de etanol a partir de glucosa (350 g/L) utilizando *S. bayanus*, obteniendo 130 g/L de etanol e indicando que en condiciones adecuadas de fermentación esta levadura es capaz de producir altas cantidades de etanol. Gökgöz & Yiğitoğlu (2013) utilizando *S. bayanus* obtuvieron 99 g/L de etanol utilizando un medio de fermentación sintético a pH 5 formulado con 100 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura y 1,0 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ esterilizado, concentración de etanol más elevada a la obtenida en el presente estudio. De estos estudios parece claro la gran influencia de los medios de fermentación sintéticos estandarizados (soluciones de glucosa, aportes nutricionales, pH óptimo) en la obtención de etanol, en comparación al uso de medios de fermentación procedentes de subproductos como el suero de quesería con una composición donde podemos encontrar ácidos orgánicos como el láctico, iones de Na^+ y Cl^- y otros minerales, una concentración alta de azúcares reductores, pH no estandarizado, etc., factores que pueden afectar la actividad de la membrana celular al producir estrés osmótico, afectando los rendimientos. Gökgöz & Yiğitoğlu (2013) trabajando con una cepa de *S. bayanus* (Colección de cultivos de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Ankara,

Turquía) en un medio de fermentación con 100 g/L de glucosa, indico que cuando el pH está por debajo de 4,5 las células de levaduras no pueden convertir la fuente de carbono en etanol, por lo cual el pH del medio de fermentación fue ajustado a 5,0 por ser considerado el pH óptimo por literatura para el desarrollo de las levaduras (Liu *et al.*, 2009, Winkelhausen *et al.*, 2010).

Se consumieron 110,61 g/L de azúcares reductores desde el inicio de la fermentación, obteniéndose 41,27±2,50 g/L de etanol y un valor teórico de 35,44 g/L de CO₂ para un total de 76,71 g/L de azúcares reductores consumidos para la producción de alcohol y un consumo de 33,87g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. Durante los días de fermentación la concentración de azúcares reductores del medio de fermentación disminuyó observándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 0 con respecto a los días 4 y 5.

La mayor productividad de etanol se obtuvo en el primer día de fermentación (0,50±0,05 g/L h) con una tendencia a disminuir hacia el quinto día de fermentación donde presentó un valor de 0,34±0,00 g/L h. En la productividad de etanol se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 1 con respecto a los días 3, 4 y 5. Barros *et al.* (1987) trabajando con *S. bayanus* obtuvieron una productividad de etanol de 1,2 g/L h en un medio de fermentación consistente en una solución de 300 g/L de glucosa. Castellar *et al.* (1998) obtuvieron una productividad de etanol de 3,07 g/L h utilizando una cepa de *S. bayanus* en medios de fermentación con 220 g/L de glucosa suplementado con 5 g/L de zeolita. Gökgöz & Yiğitoğlu (2013) reportaron una productividad de etanol de 8,23 g/ L h utilizando una cepa de *Saccharomyces bayanus* (Colección de la Universidad de Ankara, Turquía) inmovilizada en carboximetilcelulosa- γ -poli (N-vinil-2-pirrolidona) y un medio de fermentación sintético que contenía 100 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 1g/L de MgSO₄ 7H₂O (pH = 5), siendo en todos los casos citados mayor la cantidad de etanol obtenida en comparación a los resultados del presente estudio, indicando que la galactosa producida a partir de la lactosa en los permeados de sueros de quesería por acción de la β -galactosidasa es metabolizada de manera muy lenta y en algunos casos no es metabolizada por *Saccharomyces sp.* por completo, como sí sucede con la glucosa (Mehaia & Cheryan, 1990). Walker & Stewart (2016) indicaron en su

trabajo sobre la levadura *Saccharomyces* que la falta de agua disponible por efecto de altas concentraciones de azúcares o sales en el medio de fermentación, genera como respuesta fisiológica al estrés osmótico una sobreproducción de glicerol o trehalosa como una forma de proteger la membrana celular de la desecación, afectando los rendimientos al obtenerse una menor cantidad de etanol.

El mayor rendimiento de etanol por azúcares reductores se obtuvo en el día dos de fermentación ($0,45 \pm 0,19$ g/g), presentando una tendencia a disminuir hacia el quinto día ($0,35 \pm 0,02$ g/g). En este parámetro cinético no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre los días de fermentación. Castellar *et al.* (1998) utilizando una cepa de *S. bayanus* y un medio de fermentación con una concentración inicial de 220 g/L de glucosa, obtuvieron un rendimiento de etanol de 0,43 g/g, siendo más bajo al obtenido en las pruebas realizadas con los permeados concentrados de suero de quesería sin adición de NaCl. Gökgöz & Yiğitoğlu (2013) trabajando también con una cepa de *S. bayanus* y un medio de fermentación con 100 g/L de glucosa con una temperatura de fermentación de 30 °C durante 12 h en un sistema con agitación (125 rpm), reportaron un rendimiento de etanol de 0,494 g/g, siendo ligeramente superior a los obtenidos en el presente estudio.

En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación realizadas con dos réplicas utilizando la levadura *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity en permeados concentrados conteniendo 1% de NaCl.

Los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación adicionado de 1% NaCl tras el inóculo de *S. bayanus* se situaron en 1×10^5 ufc/mL, recuentos que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación hasta niveles de 2×10^7 ufc/mL, para disminuir al día quinto de fermentación a 4×10^6 ufc/mL.

El pH del medio de fermentación adicionado de 1% de NaCl presentó una disminución de 0,22 unidades durante el tiempo de fermentación, variaciones mayores a las pruebas realizadas en ausencia de NaCl, aunque el pH se situó dentro del intervalo óptimo de desarrollo de la levadura *S. bayanus*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) de pH del medio de fermentación entre el día 0 con respecto al resto de días de fermentación.

Tabla 30. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity® utilizando permeados concentrados con 1% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,93±0,12	4,79±0,12	4,78±0,13	4,73±0,14	4,72±0,15	4,71±0,15
Azúcares reductores (g/L)	285,91±11,17 ^a	259,36±12,29 ^{ab}	230,58±8,09 ^{bc}	216,45±10,24 ^c	207,50±7,31 ^{cd}	184,17±17,79 ^d
Etanol (g/L)	0,00±0,00 ^e	10,14±0,66 ^d	17,10±4,73 ^{cd}	23,07±5,54 ^{bc}	27,37±4,67 ^{ab}	34,41±1,06 ^a
Q_p (g/L h)	-	0,42±0,03	0,36±0,10	0,32±0,08	0,29±0,05	0,29±0,01
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,40±0,05	0,32±0,08	0,34±0,03	0,36±0,03	0,37±0,12

^{abcde} Medias en la misma fila para cada uno de los parámetros estudiados con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

La cantidad de etanol obtenida al quinto día fermentación fue de $34,41 \pm 1,06$ g/L, observándose una disminución del 16,62% con respecto a las pruebas realizadas en ausencia de NaCl, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 1 con respecto a los días 3, 4 y 5 de fermentación, entre el día 2 con respecto a los días 4 y 5, y entre el día 3 con respecto al día 5.

En el proceso fermentativo se consumieron 101,74 g/L de azúcares reductores desde el inicio de la fermentación, obteniéndose $34,41 \pm 1,06$ g/L de etanol y un valor teórico de 29,55 g/L de CO₂ para un total de 63,96 g/L de azúcares reductores consumidos para la producción de alcohol y un consumo de 37,78 g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. Al comparar los resultados de los azúcares reductores consumidos con los obtenidos en las pruebas sin adición de NaCl se observó una reducción de 10,91%. En los valores de azúcares reductores, y durante los diferentes días del periodo de fermentación, se produjeron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 0 con respecto a los días 2, 3, 4 y 5, y entre los días 2 y 3 con respecto al día 5 de fermentación.

La mayor productividad de etanol se obtuvo en el primer día de fermentación con una tendencia a disminuir hacia el quinto día donde presentó un valor de $0,29 \pm 0,01$. La productividad volumétrica de etanol obtenida disminuyó en un 16,62% con respecto a las pruebas realizadas en permeados concentrados sin adición de NaCl. En la productividad de etanol no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre los diferentes días de fermentación. Gökgöz & Yiğitoğlu (2013) indicaron en su trabajo sobre alta productividad de fermentación de bioetanol, que la levadura *S. bayanus* inmovilizada en carboximetilcelulosa- γ -poli (N-vinil-2-pirrolidona) obtiene una mayor productividad de etanol que la levadura *S. cerevisiae* en medios con altas concentraciones de azúcares.

El mayor y menor rendimiento de etanol expresado en base al consumo de azúcares reductores se obtuvo en el primer y segundo día de fermentación, respectivamente, presentando un valor de $0,37 \pm 0,12$ g/g en el quinto día, valor similar al obtenido en las pruebas realizadas con el permeado concentrado de sueros sin adición de NaCl. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en el rendimiento de etanol por azúcares reductores entre los días de fermentación.

En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación utilizando la levadura *S. bayanus* en permeados concentrados adicionados de 2% de NaCl.

Los recuentos microbiológicos iniciales de levaduras del medio de fermentación adicionado de 2% NaCl tras el inóculo de *S. bayanus* se situaron en 1×10^5 ufc/mL, recuentos que incrementaron durante los primeros cuatro días de fermentación, para disminuir al día quinto de fermentación de manera similar a como lo hizo en el medio de fermentación adicionado de 1% NaCl.

El pH del medio de fermentación presentó una disminución de 0,25 unidades, descenso de pH similar al obtenido en las pruebas con 1% de NaCl, pero mayor al obtenido en las pruebas sin adición de NaCl. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) del pH del medio de fermentación entre los diferentes días de fermentación.

La cantidad de etanol obtenida en el medio de fermentación conteniendo 2% de NaCl en el quinto día fue de $23,20 \pm 1,69$ g/L, valor que al compararlo con los resultados de las pruebas sin adición de NaCl se observa que disminuyó un 43,78% y un 16,62% en las pruebas realizadas con permeados concentrados adicionados de un 1% de NaCl. Se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la cantidad de etanol obtenido entre el día 1 con respecto a los días 3, 4 y 5, entre el día 2 en comparación a los días 4 y 5, y entre el día 3 en comparación al día 5 de fermentación (Tabla 31).

La Tabla 32 muestra el efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores por la levadura *S. bayanus*.

Al comparar los valores de etanol en los permeados estudiados con diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%), se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la cantidad de etanol obtenido al día 1 de fermentación en los permeados adicionados de 2% de NaCl con respecto a los no añadidos de NaCl, y al día 5 de fermentación entre los tres tipos de permeados (Tabla 32).

Tabla 31. Composición (concentraciones de azúcares reductores y etanol) y pH del medio de fermentación, rendimiento de etanol ($Y_{E/S}$) y productividad de etanol (Q_p) obtenidos con la levadura *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity® utilizando permeados concentrados con 2% de NaCl procedentes de sueros de quesería desproteinizados.

Parámetros	Día de fermentación					
	0	1	2	3	4	5
pH	4,93±0,12	4,76±0,10	4,73±0,09	4,69±0,09	4,68±0,10	4,68±0,09
Azúcares reductores (g/L)	284,78±9,57 ^a	264,99±9,63 ^{ab}	254,60±11,72 ^{bc}	235,45±7,31 ^{cd}	227,98±11,12 ^{cd}	218,84±11,58 ^d
Etanol (g/L)	0,00±0,00 ^e	9,07±1,02 ^d	12,97±3,01 ^{cd}	17,62±0,98 ^{bc}	19,04±2,13 ^{ab}	23,20±1,69 ^a
Q_p (g/L h)	-	0,42±0,03 ^a	0,31±0,06 ^b	0,25±0,01 ^{bc}	0,20±0,02 ^c	0,19±0,01 ^c
$Y_{E/S}$ (g/g)	-	0,46±0,04	0,43±0,02	0,37±0,09	0,35±0,08	0,37±0,08

^{abcde} Medias en la misma fila para cada uno de los parámetros estudiados con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

Al generarse estrés celular por efecto del NaCl disuelto en el permeado concentrado, tiende a disminuir el crecimiento celular, incrementando los tiempos de fermentación y reduciendo la cantidad de etanol producido durante la fermentación. Esto se origina principalmente por el proceso de adaptación celular al estrés salino que implica un cambio en la homeostasis celular por flujo del agua intracelular al exterior de la célula, reducción del tamaño de la célula por efecto de la pérdida de agua y en una segunda etapa la producción de osmolitos como el glicerol que se acumula en la célula, interviniendo en el mantenimiento del volumen celular al generar un potencial osmótico más bajo del citoplasma y favorecer el reingreso de parte del agua perdida, logrando un equilibrio en los fluidos y permitiendo que la célula vuelva a crecer (Albertyn *et al.*, 1994; Blomberg, 2000; Alexandre *et al.*, 2001; Beney *et al.*, 2001; Dmitrieva *et al.*, 2005).

Tabla 32. Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores obtenidos con la levadura *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

NaCl (%)	Azúcares reductores (g/L)		Alcohol (g/L)	
	Día (0-5)*	1	Día	5
0	110,58±10,55 ^a	11,93±1,17 ^a	41,27±2,50 ^a	
1	101,75±26,19 ^a	10,14±0,66 ^{ab}	34,41±1,06 ^b	
2	65,94±16,30 ^b	9,07±1,02 ^b	23,20±1,69 ^c	

*Azúcares consumidos por la levadura durante el periodo de fermentación (5 días).

^{abc} Medias en la misma columna para cada uno de los días y parámetros con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

Durante el proceso fermentativo en presencia del 2% de NaCl se consumieron 65,94 g/L de azúcares reductores desde el inicio de la fermentación, obteniéndose 23,20±1,69 g/L de etanol y un valor teórico de 19,92 g/L de CO₂ para un total de 43,12 g/L de azúcares reductores consumidos para la producción de alcohol y un consumo de 22,82 g/L de azúcares reductores en producción de masa celular y otras sustancias producto de la fermentación. Al comparar los resultados obtenidos con las pruebas realizadas se pudo observar un descenso en la cantidad de azúcares reductores consumidos del 40,37% con

respecto a las pruebas realizadas sin adición de NaCl, y del 35,19% con respecto a las pruebas realizadas con un permeado concentrado adicionado de 1% de NaCl (Tabla 32).

Durante la fermentación los valores hallados de azúcares reductores en el medio conteniendo 2% de NaCl presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 0 con respecto a los días 2, 3, 4 y 5, entre el día 1 en comparación a los días 3, 4 y 5, y entre el día 2 en comparación al día 5 (Tabla 31).

Al comparar los valores obtenidos entre las pruebas de fermentación realizadas con permeados concentrados conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%), se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en el consumo de azúcares reductores (días 0–5) por *S. bayanus* entre los permeados añadidos de 2% de NaCl con respecto al añadido de 1% de NaCl y los permeados no añadidos. Sin embargo, no se observaron tales diferencias ($p \geq 0,05$) entre los permeados sin adición de NaCl y los añadidos de 1% de NaCl (Tabla 32). Wimalasena *et al.* (2014) en su trabajo sobre caracterización fenotípica de levaduras de *Saccharomyces* spp por tolerancia al estrés encontrada durante la fermentación de residuos lignocelulósicos para producir bioetanol, encontraron que las cepas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* presentan tolerancias similares al estrés hiperosmótico por NaCl. Perez-Torado *et al.* (2016) trabajando sobre estrategias alternativas de equilibrio de glicerol entre especies de *Saccharomyces* spp en respuesta al estrés de vinificación, indicaron que algunas cepas de *S. bayanus* var. *uvarum* soportan mejor el estrés hiperosmótico por NaCl que otras especies de *S. cerevisiae* por un manejo más eficiente del glicerol intracelular. Estos resultados concuerda con los obtenidos en el presente estudio ya que en condiciones de ausencia o de 1% de NaCl *S. cerevisiae* produce más etanol que *S. bayanus*, sin embargo, al incrementar la concentración a 2% NaCl en el medio de fermentación ambas levaduras producen cantidades similares.

La Tabla 33 muestra el efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre los parámetros cinéticos de productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) durante los días 1 y 5 obtenidos con la levadura *S. bayanus*.

La mayor productividad de etanol, utilizando el medio de fermentación añadido de 2% de NaCl, se obtuvo en el primer día de fermentación ($0,42 \pm 0,03$ g/L h) con una tendencia a

disminuir hacia el quinto día de fermentación ($0,19 \pm 0,01$ g/L h), observándose una pérdida de productividad del 44,12% y del 34,48% con respecto a las pruebas de fermentación utilizando permeados concentrados sin o con adición de 1% de NaCl, respectivamente, al 5 día de fermentación (Tabla 33). En el parámetro cinético de productividad de etanol se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el día 1 con respecto al resto de días de fermentación, y entre el día 2 con respecto a los días 4 y 5 de fermentación (Tabla 31).

Tabla 33. Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento de etanol por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con la levadura *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

NaCl (%)	Q_p (g/L h)		$Y_{E/S}$ (g/g)	
	Día		Día	
	1	5	1	5
0	$0,50 \pm 0,05^a$	$0,34 \pm 0,02^a$	$0,42 \pm 0,19^a$	$0,35 \pm 0,02^a$
1	$0,42 \pm 0,03^a$	$0,29 \pm 0,01^b$	$0,40 \pm 0,05^a$	$0,37 \pm 0,12^a$
2	$0,42 \pm 0,03^a$	$0,19 \pm 0,01^c$	$0,46 \pm 0,04^a$	$0,37 \pm 0,08^a$

^{abc} Medias en la misma columna para cada uno de los días y parámetros cinéticos con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

Al comparar las medias de la productividad de etanol utilizando los medios de fermentación añadidos de diferentes cantidades de NaCl (0, 1 y 2%) no se pudieron constatar diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) para este parámetro cinético al primer día de fermentación para ninguna de las concentraciones de NaCl estudiadas, mientras que al quinto día de fermentación sí se pudieron observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las distintas concentraciones de NaCl presentes en los medios de fermentación (Tabla 33).

El mayor rendimiento de etanol por azúcares reductores se obtuvo en el primer día de fermentación ($0,46 \pm 0,04$ g/g), presentando una tendencia a disminuir hacia el quinto día donde se obtuvo un valor de $0,37 \pm 0,08$ g/g, similares a los obtenidos en las pruebas realizadas con permeados concentrados de sueros sin y con 1% de NaCl, no observándose

diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre los días de fermentación (Tabla 30).

Al comparar los valores obtenidos del parámetro cinético de rendimiento de etanol expresado por el consumo de azúcares reductores tampoco pudo evidenciarse diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre los permeados concentrados con diferentes concentraciones de NaCl estudiadas en los días 1 y 5 del proceso fermentativo (Tabla 33). En términos generales varios autores coinciden que se conoce poco acerca de la respuesta de *S. bayanus* al estrés hiperosmótico con NaCl asociado a condiciones naturales o de fermentación (Naumov *et al.*, 2002; Rementeria *et al.*, 2003; Demuyter *et al.*, 2004) y por consiguiente su efecto sobre los parámetros cinéticos de productividad de etanol.

4.2.4 Comparativa de los procesos de fermentación utilizando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® y *Saccharomyces bayanus* Fermiline Tipicity® con diferentes concentraciones de NaCl

Saccharomyces cerevisiae es una de las levaduras más utilizadas en procesos fermentativos y en términos generales a nivel industrial en procesos fermentativos como panificación durante la elaboración de pan, en la producción de levadura para ser usada en la alimentación animal y humana como fuente de proteína, en la industria cervecera para la elaboración de cervezas, en la industria licorera para la producción de etanol utilizado para elaborar diferentes variedades de licores y en la industria vinícola donde se usan algunas cepas de esta levadura, mientras que *S. bayanus* es utilizada en la elaboración de vinos principalmente con retardos de fermentación por su capacidad de tolerar altas concentraciones de etanol.

En la Figura 24 se representa la evolución del pH del medio de fermentación y el efecto de la concentración de NaCl durante el proceso realizado por las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, observándose que para ambas levaduras el pH del medio tendió a disminuir, aunque de una forma más abrupta en el caso de *S. cerevisiae*, posiblemente por efecto de los coproductos originados durante la fermentación, pH que se mantuvo en los dos medios dentro del intervalo de pH óptimo de fermentación de 4,5-5,0.

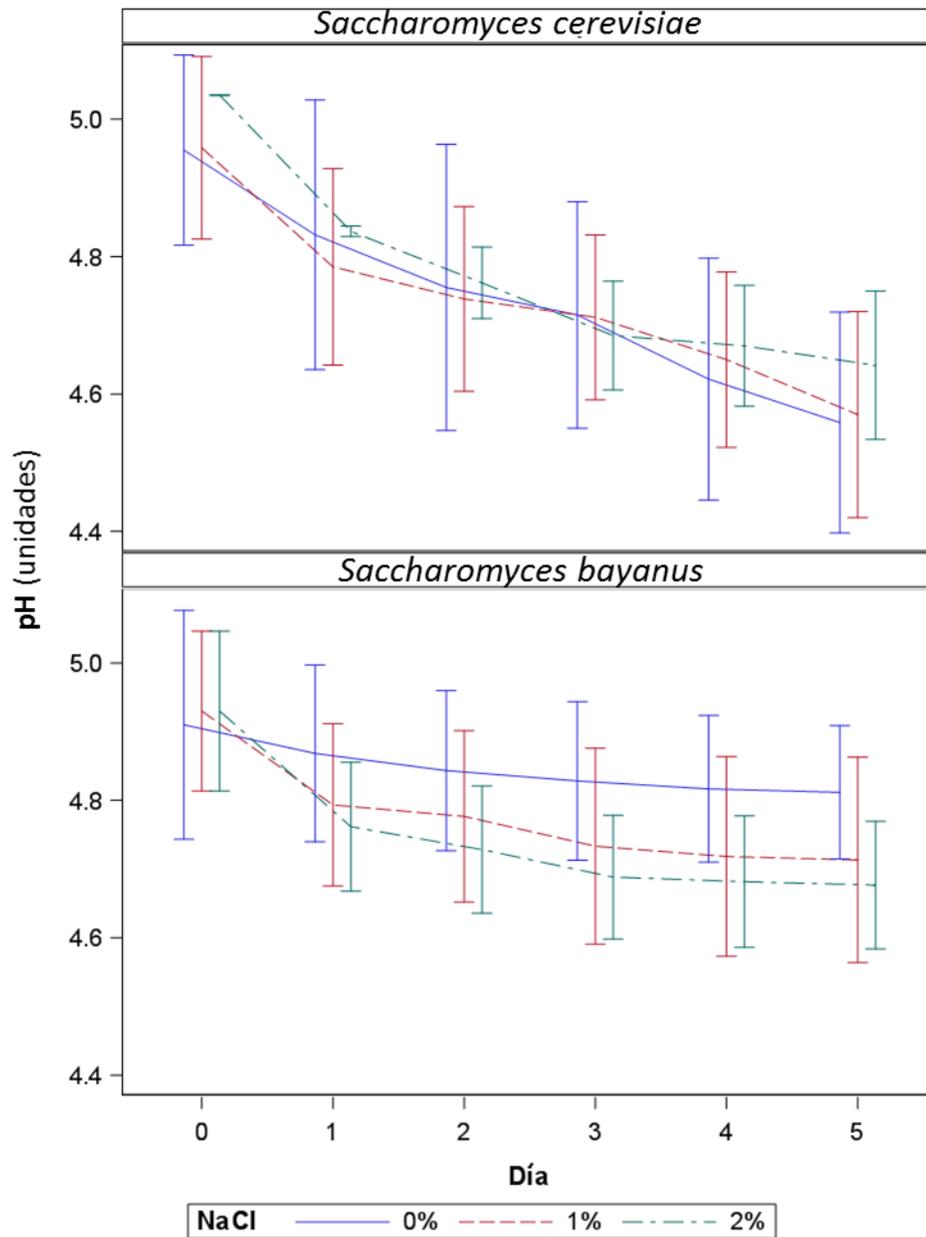


Figura 24. Evolución del pH en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

La Figura 25 muestra la evolución de la concentración de azúcares reductores del medio de fermentación con diferentes cantidades de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso fermentativo realizado por las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

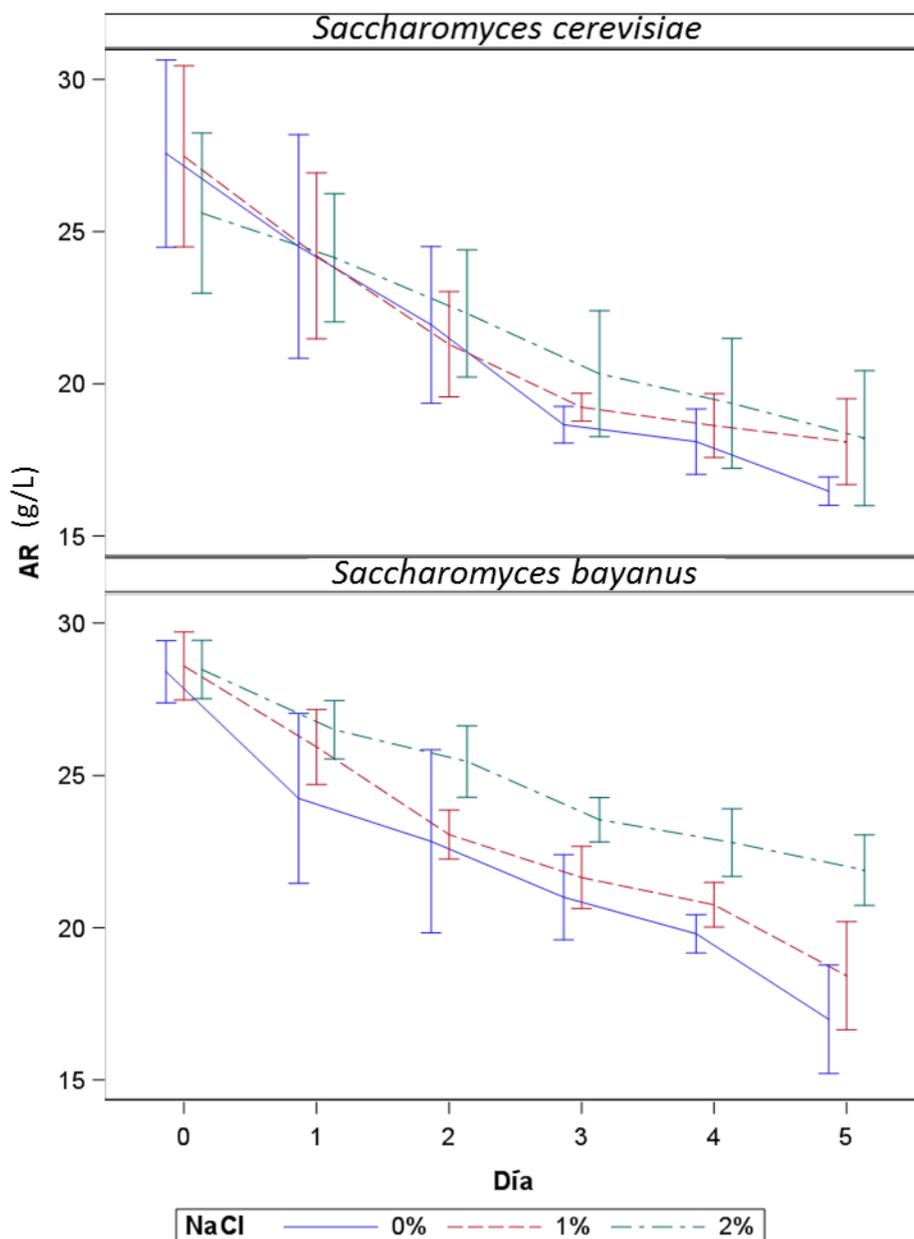


Figura 25. Evolución de la concentración de azúcares reductores (AR) del medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

Para ambas levaduras se observan una disminución en el consumo de azúcares reductores al incrementarse la concentración de NaCl en el medio de fermentación. Sin embargo, del gráfico comparativo se puede poner de manifiesto el mayor consumo de azúcares reductores a todas las concentraciones de NaCl presentes en el medio de fermentación por *S. cerevisiae*, y la inhibición más acusada en el consumo de azúcares reductores en el medio de fermentación adicionado de 2% NaCl por *S. bayanus* en comparación a *S. cerevisiae*.

En la Figura 26 se presenta la evolución de la concentración de etanol en el medio de fermentación adicionado de diferentes cantidades de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso fermentativo realizado por las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, mostrando una cinética más activa de producción de etanol, aunque con una mayor variabilidad, por parte de *S. cerevisiae*, sobre todo cuando el medio de fermentación presenta una adición de NaCl hasta el 1%, siendo muy similar el comportamiento de ambas levaduras en producción de etanol cuando el medio de fermentación contiene 2% NaCl.

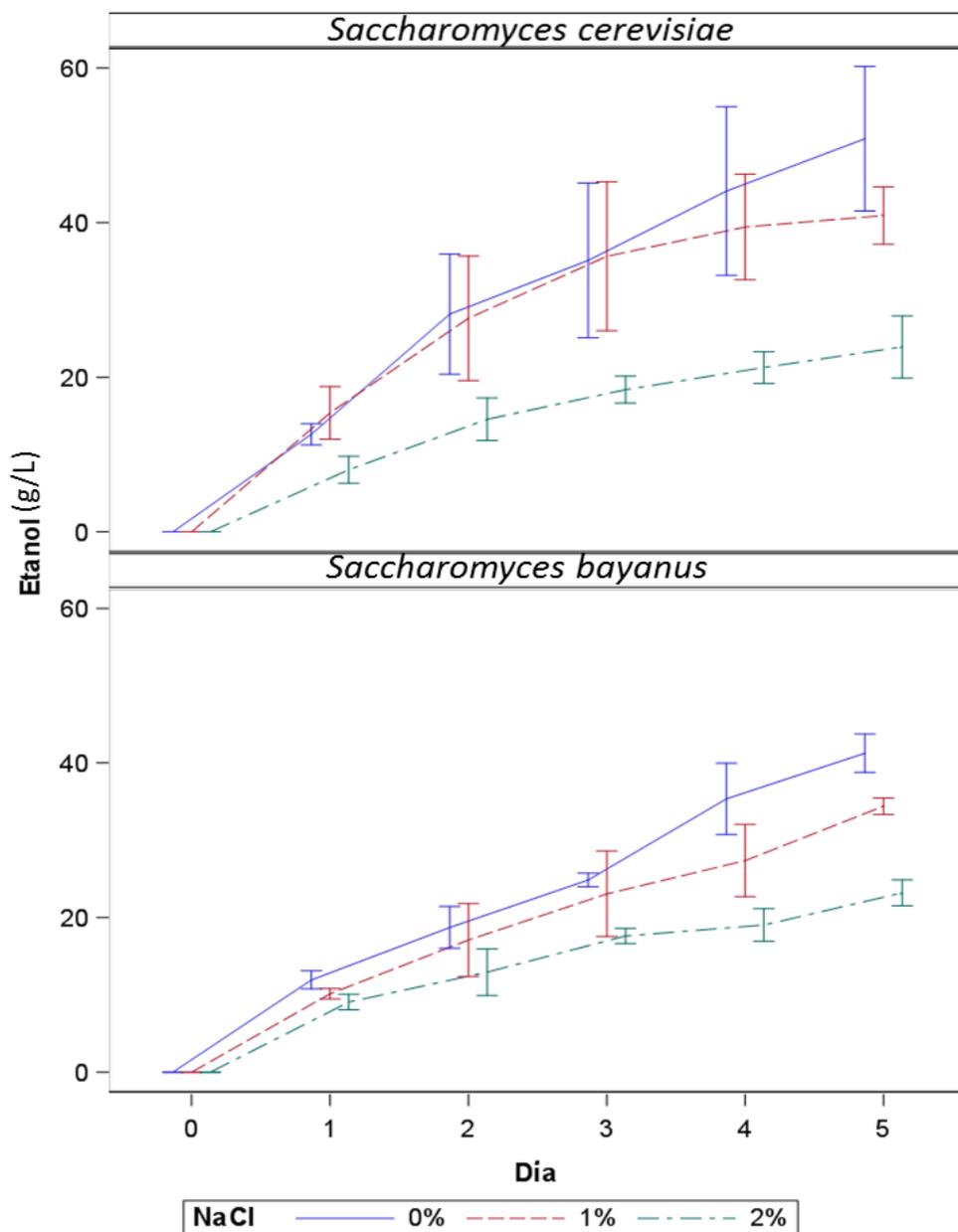


Figura 26. Evolución de la concentración de etanol en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

La Tabla 34 compara el efecto de la inclusión de NaCl (0, 1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y el consumo de azúcares reductores obtenidos con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Tabla 34. Efecto de la inclusión de NaCl (0, 1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la concentración de etanol producido y consumo de azúcares reductores obtenidos con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® y *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

NaCl (%)	Levadura	Azúcares reductores (g/L)		Etanol (g/L)	
		Día		Día	
		(0 -5)*		1	5
0	<i>S. cerevisiae</i>	110,90±24,72 ^a	12,63±1,63 ^a	50,86±9,34 ^a	
	<i>S. bayanus</i>	110,58±10,55 ^a	11,93±1,17 ^a	41,27±2,50 ^a	
1	<i>S. cerevisiae</i>	93,73±15,65 ^a	15,40±3,41 ^a	40,93±3,71 ^a	
	<i>S. bayanus</i>	101,75±26,19 ^a	10,14±0,66 ^{b(1)}	34,41±1,06 ^b	
2	<i>S. cerevisiae</i>	73,90±11,03 ^a	8,03±1,76 ^a	23,93±1,69 ^a	
	<i>S. bayanus</i>	65,94±16,30 ^a	9,07±1,02 ^a	23,20±1,69 ^a	

* Azúcares consumidos por las levaduras durante el periodo de fermentación (5 días).

^{ab} Medias en la misma columna para cada una de las diferentes concentraciones de NaCl, días, parámetros estudiados y para cada una de las levaduras, con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

^{b(1)} $p = 0,059$

En las pruebas realizadas con permeados concentrados sin adición de NaCl y al inicio (día 1) y final (día 5) de fermentación se observó que ambas levaduras consumieron cantidades similares de azúcares reductores, no habiendo diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Con respecto a las cantidades obtenidas de etanol producido a los días 1 y 5 de fermentación, si bien *S. cerevisiae* produjo concentraciones más elevadas respecto de *S. bayanus*, estas diferencias no fueron significativas ($p \geq 0,05$). Sin embargo, estas diferencias en la concentración de etanol sí fueron significativas ($p \leq 0,05$) al quinto día del proceso de fermentación entre las levaduras estudiadas cuando el medio de fermentación fue añadido de 1% de NaCl (15,93% más de etanol por *S. cerevisiae* en comparación con *S. bayanus*), mientras que las cantidades obtenidas de etanol al día 1 de fermentación solo fueron significativamente diferente entre las levaduras (34,15% más para *S. cerevisiae* en comparación a *S. bayanus*) para un nivel de significación del 5,9%. Al incrementar la concentración de NaCl al 1% en el permeado concentrado de suero de quesería, se observó que la levadura *S. cerevisiae* consumió 7,88% menos de azúcares reductores que la levadura *S. bayanus*, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p \geq 0,05$).

En los ensayos realizados en permeados concentrados de suero de quesería con 2% de NaCl se pudo observar que *S. bayanus* consumió un 10,77% menos de azúcares reductores que *S. cerevisiae*, sin embargo, estas diferencias de nuevo no fueron significativas. Tampoco se observaron diferencias significativas entre levaduras en la producción de etanol a los días 1 y 5 del proceso de fermentación.

Guimarães *et al.* (2010) trabajando sobre fermentación de lactosa por levaduras, como parte de una solución integrada para la valorización del suero de quesería y obtención de bioetanol, indicaron que la levadura *S. cerevisiae* es la más utilizada en procesos industriales para la producción de etanol, por su capacidad de fermentación y tolerancia a factores que generan estrés a las levaduras. Naumova *et al.* (2005) y Fukuda *et al.* (2009) indicaron que *S. cerevisiae* y *S. bayanus* son levaduras de gran importancia industrial utilizadas ampliamente en procesos de producción de bebidas alcohólicas como vino y cerveza por los altos rendimientos y capacidad de fermentar azúcares.

De manera general también se ha podido constatar que la cantidad de etanol producido por ambas levaduras tiende a disminuir con el incremento de la concentración de NaCl, coincidiendo estos resultados con los reportados por otros autores que indican que al incrementar la concentración de NaCl, las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus* tienden a reducir el consumo de azúcares reductores fermentables, incrementar los tiempos de fermentación y disminuir la producción de etanol por disminución del crecimiento celular, por efecto de la adaptación al estrés producido por el NaCl y toxicidad del ion Na^+ sobre la membrana celular (Albertyn *et al.*, 1994; Blomberg, 2000; Alexandre *et al.*, 2001; Beney *et al.*, 2001; Dmitrieva *et al.*, 2005).

La Figura 27 muestra la evolución del parámetro cinético de productividad de etanol utilizando medios de fermentación adicionados de diferentes cantidades de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso fermentativo realizado por las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, observándose que las mayores productividades de etanol se obtuvieron el primer día de fermentación para después disminuir hasta el día 5 de fermentación. Las curvas observadas para este parámetro cinético mostraron una mayor productividad de etanol pero también una caída más brusca para *S. cerevisiae* en comparación a *S. bayanus*, y un efecto más marcado sobre la productividad de etanol cuando el medio de fermentación es adicionado

de 2% de NaCl para *S. cerevisiae* que al utilizar medios de fermentación sin adición de NaCl o adicionado de 1%, en comparación de *S. bayanus*.

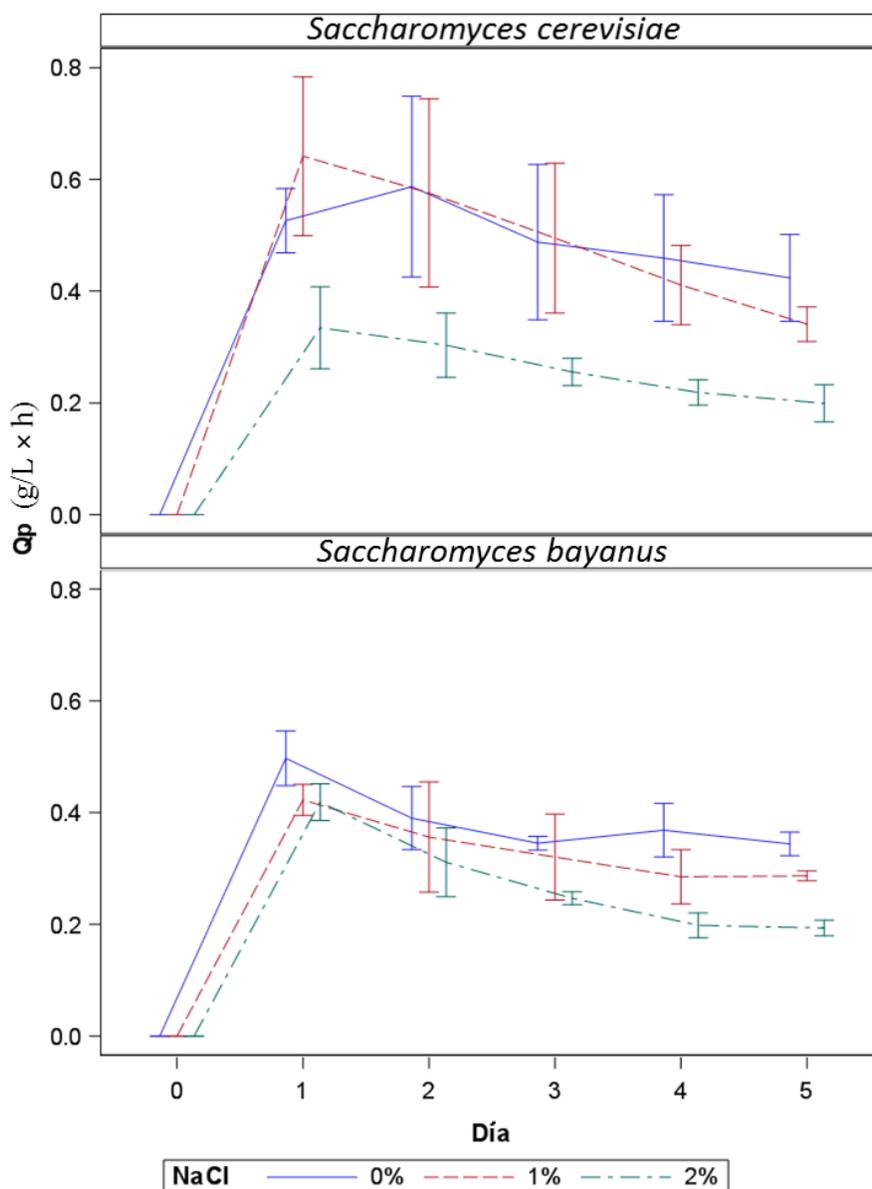


Figura 27. Evolución de la productividad de etanol (Q_p) en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

Perez-Torado *et al.* (2016) en su trabajo entre especies de *Saccharomyces spp* en respuesta al estrés de vinificación mostraron la mayor tolerancia al estrés hiperosmótico de diferentes especies de *S. bayanus* en comparación a *S. cerevisiae*. Así por ejemplo, *S. bayanus* var. *uvarum* BMV58 soporta un estrés hiperosmótico con concentraciones de hasta 4,7% de NaCl (0,8 M) con crecimiento y metabolismo celular intermedio por efecto de la toxicidad que provoca el Na⁺, siendo la producción de glicerol intracelular muy importante para el equilibrio osmótico durante la primera fase de la fermentación (Oliveira *et al.*, 2014), lo que permite la viabilidad celular con implicaciones en el rendimiento de la fermentación (Remize *et al.*, 2001), lo que explicaría los resultados observados en nuestro estudio.

En la Figura 28 muestra la evolución del parámetro cinético de rendimiento de etanol en base a los azúcares reductores utilizando medios de fermentación adicionados de diferentes cantidades de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso fermentativo realizado por las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, observándose niveles de rendimiento de etanol mayores para *S. cerevisiae* pero sin grandes cambios en el patrón de evolución de esta parámetro cinético para ambas levaduras que se mantuvo estable a lo largo de los diferentes días de fermentación. En el caso del efecto del incremento en las concentraciones de NaCl en el medio de fermentación sobre el rendimiento de etanol, se observa que los valores no presentaron una tendencia definida de inhibición durante el tiempo de fermentación al aumentar la cantidad de NaCl (%) para ambas levaduras, indicando que estas mantienen la actividad metabólica excepto para *S. cerevisiae* con respecto al medio adicionado de 2% de NaCl, donde se evidencia que la actividad metabólica es afectada por la concentración presente de NaCl en el medio. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gökğöz & Yiğitoğlu (2013) donde indicaron que *S. bayanus* tiene una mejor respuesta al estrés hiperosmótico que *S. cerevisiae* en medios con alta concentración de azúcares y sales, estos resultados también coinciden con los indicados por el fabricante de la cepa *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity® que recomienda su uso cuando se presentan fermentaciones tardías, por efecto de altas concentraciones de azúcares en el medio de fermentación, con una cinética fermentativa óptima incluso en condiciones desfavorables de alto grado alcohólico (DOLMAR, 2018). Ma *et al.* (2016a) indicaron que la actividad fermentativa se mantiene debido a que las células de levadura sintetizan abundante glicerol para resistir al estrés osmótico. El glicerol producido protege a las células y favorece el crecimiento

celular. La inhibición ocurre cuando la producción celular se reduce por el incremento en la productividad de etanol. Este fenómeno se produce con altas concentraciones de estrés osmótico (Moawad, 2016).

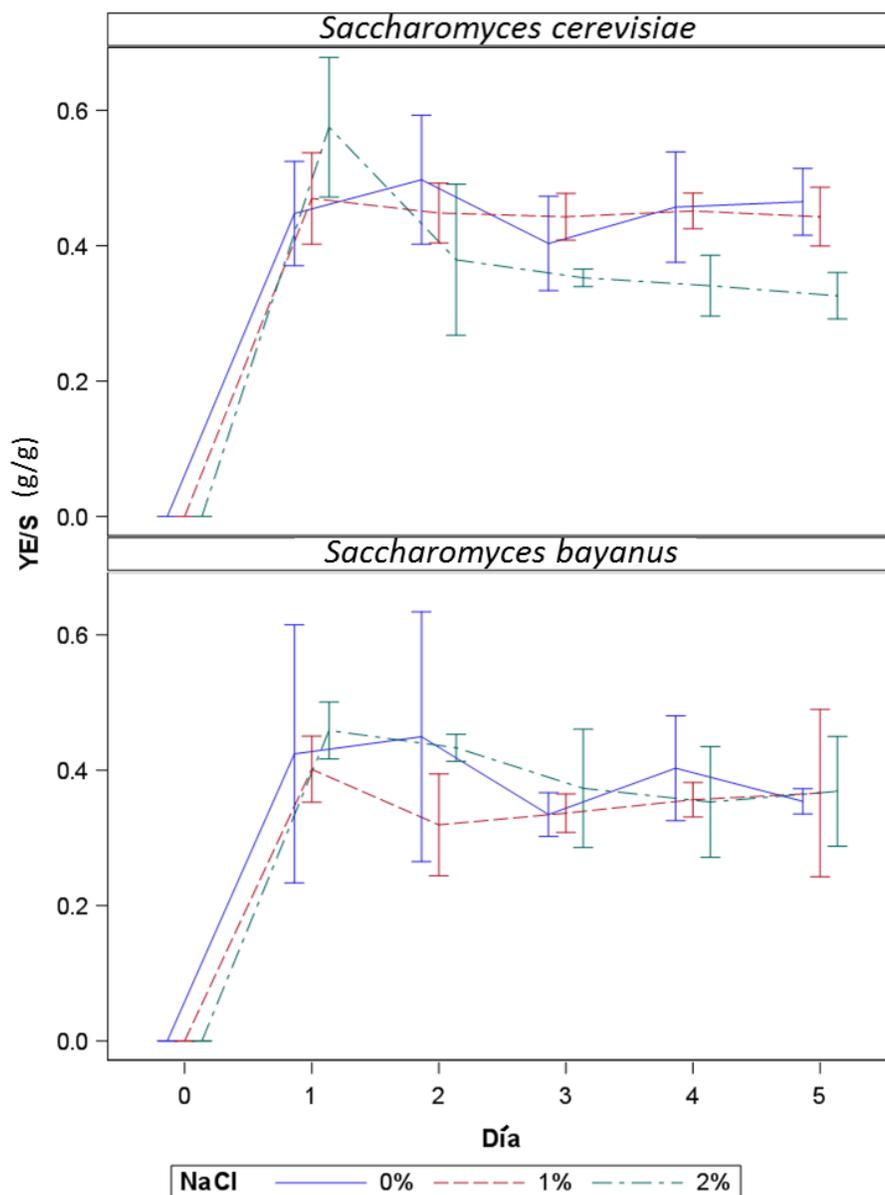


Figura 28. Evolución del rendimiento de etanol en base a azúcares reductores ($Y_{E/S}$) en el medio de fermentación y efecto de la concentración de NaCl (0, 1 y 2%) durante el proceso de fermentación realizado por las levaduras *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

En la Tabla 35 se comparan los parámetros cinéticos de productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en permeados concentrados de suero de quesería adicionados de diferentes cantidades de NaCl (0, 1 y 2%).

Tabla 35. Efecto de la inclusión de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre la productividad de etanol (Q_p) y de rendimiento por azúcares reductores consumidos ($Y_{E/S}$) obtenidos con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® y *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity®.

NaCl (%)	Levadura	Q_p (g/L h)		$Y_{E/S}$ (g/g)	
		Día		Día	
		1	5	1	5
0	<i>S. cerevisiae</i>	0,53±0,06 ^a	0,42±0,08 ^a	0,45±0,08 ^a	0,47±0,05 ^a
	<i>S. bayanus</i>	0,50±0,05 ^a	0,34±0,02 ^a	0,42±0,19 ^a	0,35±0,02 ^b
1	<i>S. cerevisiae</i>	0,64±0,14 ^a	0,34±0,03 ^a	0,47±0,07 ^a	0,44±0,04 ^a
	<i>S. bayanus</i>	0,42±0,03 ^{b(1)}	0,29±0,01 ^b	0,40±0,05 ^a	0,37±0,12 ^a
2	<i>S. cerevisiae</i>	0,33±0,07 ^a	0,20±0,03 ^a	0,58±0,10 ^a	0,33±0,03 ^a
	<i>S. bayanus</i>	0,42±0,03 ^a	0,19±0,01 ^a	0,46±0,04 ^a	0,37±0,08 ^a

*Azúcares consumidos por las levaduras durante el periodo de fermentación (5 días).

^{ab} Medias en la misma columna para cada una de las diferentes concentraciones de NaCl, días, parámetros estudiados y para cada una de las levaduras, con diferente superíndice difiere significativamente ($p \leq 0,05$).

^{b(1)} $p = 0,059$

Las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus* presentaron productividades de etanol (Q_p) que no fueron significativamente diferentes ($p \geq 0,05$) durante el primer y quinto día de fermentación cuando utilizaron permeados concentrados de sueros de quesería sin adición de NaCl como medio de fermentación, si bien los valores de este parámetro cinético fueron siempre superiores en el caso de *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando el rendimiento en etanol se expresó en base a los azúcares consumidos ($Y_{E/S}$), se evidenciaron diferencias significativas para este parámetro entre las levaduras en el quinto día de fermentación, no así en el primer día de fermentación.

Al adicionar al medio de fermentación NaCl en concentración del 1%, *S. cerevisiae* y *S. bayanus* presentaron diferencias ($p \leq 0,05$) en la productividad de etanol (superior en *S.*

cerevisiae) claramente visible en el quinto día de fermentación (0,34 y 0,29 para *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, respectivamente) y también en el día 1 de fermentación aunque con un nivel de significación del 5,9%. Por el contrario, cuando se calculó la producción de etanol en base al consumo de azúcares reductores, el análisis estadístico no fue capaz de mostrar diferencias significativas para las levaduras estudiadas cuando el medio de fermentación contuvo 1% de NaCl.

Con respecto a las pruebas realizadas con permeados de suero de quesería conteniendo 2% de NaCl, no se pudo observar diferencias significativas ($p \geq 0,05$) para *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en el primer o quinto día de fermentación en los parámetros cinéticos estudiados.

4.2.5 Calidad del etanol obtenido a partir de permeados concentrados de suero de quesería utilizando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Levapan® y *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity®

La producción y comercialización del etanol para consumo humano está regulado por las normativas y leyes de cada país, y en ellas se busca que el producto sea inocuo para el ser humano, al no producir al consumidor intoxicaciones por presencia de coproductos producidos durante la fermentación, como metanol y furfural o añadidos (adulteración) durante su comercialización, con la finalidad de reducir el costo de los mismos, como agua y metanol (Norma COVENIN 3340, 1997). La mayoría de los trabajos relacionados con la producción de bioetanol a partir de sueros o permeados lácticos han centrado por décadas sus esfuerzos (Tomaszewska & Białończyk, 2016) en el estudio de la fermentación de la lactosa en etanol mediante el uso de *K. marxianus* que puede convertir la lactosa directamente en glucosa y galactosa, y metabolizar estos monosacáridos en etanol, midiendo la eficiencia y condiciones óptimas de fermentación (Dinitz *et al.*, 2014; Hadiyanto *et al.*, 2014), o en el uso de *S. cerevisiae* con adición de enzimas exógenas (Parashar *et al.*, 2016; Tomaszewska & Białończyk, 2016). Sin embargo, existe una bibliografía muy limitada en la producción de etanol de grado alimentario para consumo humano (Ling, 2008; Dragone *et al.*, 2009), donde se describa la presencia de compuestos de interés para salud pública como metanol, alcoholes superiores y furfural relacionados con las condiciones de fermentación y tipo de suero o permeado utilizado. Recientemente, Derrick *et al.* (2019) han indicado la falta de investigación en esta área, y especialmente

sobre la composición de compuestos volátiles en destilados de suero de quesería, ya que la composición del suero puede variar según el tipo de queso, lo que sugiere que los compuestos aromáticos volátiles en los destilados también podrían variar, afectando la calidad de los destilados.

Los cromatogramas de los destilados obtenidos en las pruebas realizadas con la levadura *S. cerevisiae* marca Levapan® en medios de fermentación en ausencia o presencia de NaCl (1 y 2%) se presentan en la Figura 29, donde se puede observar que el único compuesto que se detectó, en las condiciones cromatográficas ensayadas, fue el etanol, no detectándose metanol en los destilados obtenidos a partir de los diferentes medios de fermentación. El metanol no es un producto típico de las fermentaciones alcohólicas que utilizan como medios sueros o permeados de origen láctico, ya que es un derivado de la hidrólisis natural de las pectinas por enzimas pectinolíticas producidas por cepas de *S. cerevisiae*, siendo la enzima pectinesterasa la que hidroliza el enlace éster entre el ácido galacturónico y el metanol, por lo que este alcohol se encuentra principalmente cuando se incluyen los hollejos de las uvas o las frutas en el medio de fermentación, de ahí que los considerados licores de frutas presenten mayores concentraciones de este alcohol (Acosta, 2012). Por consiguiente, los resultados obtenidos donde no se detectó presencia de metanol en los ensayos realizados corresponden a lo esperado, ya que las pectinas no forman parte de la composición natural de los permeados concentrados de suero de quesería. Dragone *et al.* (2009) en su estudio sobre caracterización de compuestos volátiles en una bebida alcohólica producida por fermentación de suero, no hallaron presencia de metanol ni furfural dentro de los 40 compuestos volátiles presentes en el destilado, identificados mediante GC-MS, catalogando a esta bebida como segura para su consumo humano. Puente (2018) trabajó en la elaboración de una bebida alcohólica a partir de suero dulce de leche proveniente de queso fresco y mora utilizando la levadura *S. cerevisiae*, obteniendo valores de metanol entre 0,28 y 0,45 mg/L, siendo estos valores muy bajos con respecto a la especificación sanitaria, contenidos que fueron asociados a la hidrólisis de las pectinas que contiene la mora. Walker & Stewart (2016) indicaron que *S. cerevisiae* en la producción de bebidas fermentadas no produce metanol como metabolito durante la fermentación secundaria sino alcoholes superiores, ésteres, compuestos de carbonilo, ácidos orgánicos, polioles, dicetonas vecinales, compuestos de azufre y compuestos fenólicos.

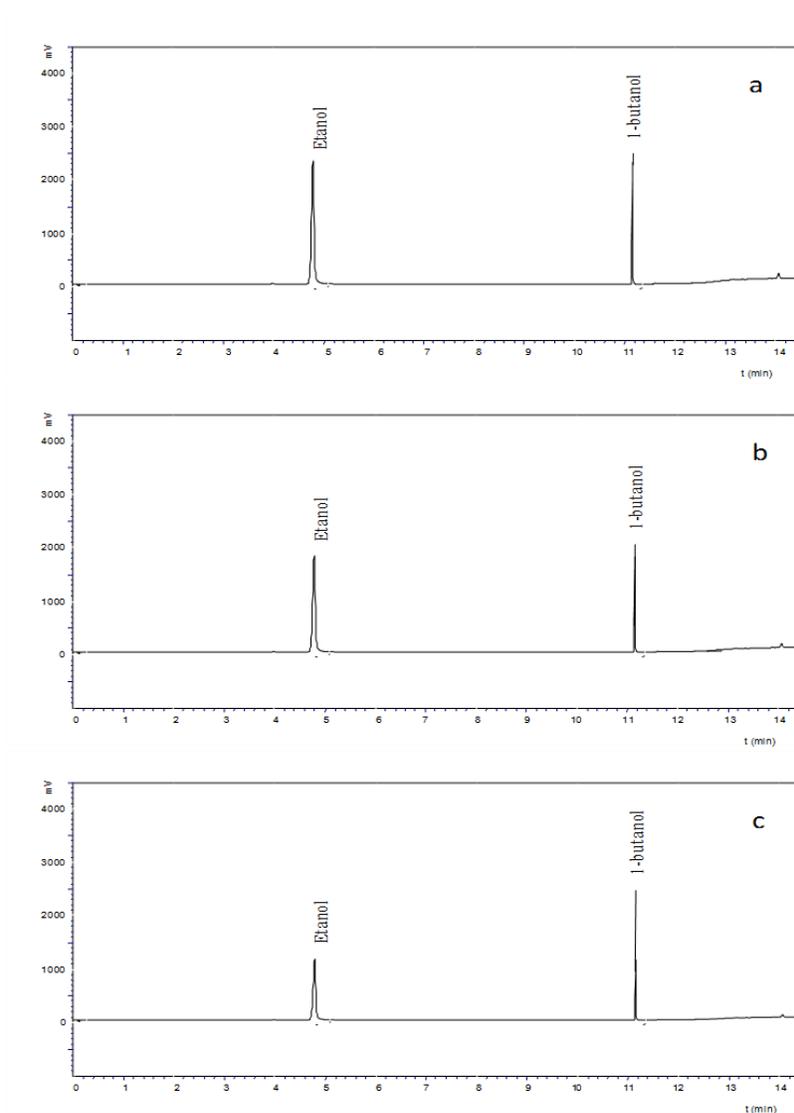


Figura 29. Cromatogramas GC-FID de los destilados obtenidos de medios de fermentación en ausencia (a) o presencia de 1% (b) y 2% (c) de NaCl utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marca Fermiline Tipicity®.

En la Figura 30 se presentan los cromatogramas GC-FID de los destilados obtenidos de medios de fermentación sin adición o adicionados de NaCl (1 y 2%) utilizando la levadura *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity®, no detectándose metanol en los destilados obtenidos, siendo el único alcohol cuantificable el etanol, siendo estos resultados similares a los obtenidos con *S. cerevisiae* marca Levapan®. En el caso de *S. bayanus* son muy escasas las investigaciones donde se utiliza esta levadura en la fermentación de suero de quesería, ya que generalmente es utilizada en la fabricación de vinos, y es considerada una

cepa segura en la industria de bebidas alcohólicas. Znamirowska *et al.* (2017) realizaron un estudio de fermentación de suero para la obtención de bebidas, partiendo de sueros con un contenido natural de lactosa de 4,73% que fue o no hidrolizada con la enzima β -galactosidasa a una temperatura de 8 a 10 °C durante 12 h. Estos sueros fueron inoculados con la levadura *S. bayanus* (cepa G995) para realizar una fermentación por 28 días, obteniendo bebidas con diferentes características sensoriales dependiendo del suero utilizado (con lactosa o sin lactosa) sin indicarse la presencia de metanol en ninguna de ellas.

Naumov *et al.* (2001) en su trabajo sobre información genética de cepas de levadura pectinolíticas SCPP de la variedad *S. bayanus* var *uvarum*, pusieron de manifiesto la capacidad de producir enzimas pectinolíticas, entre ellas la poligalacturonasa, la pectina liasa y la pectina esterasa, esta última con capacidad de romper enlaces ésteres de la pectina, liberando el metanol en el medio de fermentación. Sin embargo, en las revisiones realizadas de trabajos de suero de quesería fermentados utilizando *S. bayanus* no se reporta la presencia de metanol en los destilados, lo cual está relacionado a dos factores: por una parte, la pectina no está presente en la composición del suero de quesería, por consiguiente no hay sustrato, y por otro lado son pocas las levaduras que poseen el gen PGL1 que les permite producir enzimas pectinolíticas, gen generalmente asociado a levaduras autóctonas, por lo que el uso de *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity® puede considerarse una levadura no productora de metanol ya que en las condiciones utilizadas en este estudio, reduce al mínimo la formación de metanol durante la fermentación.

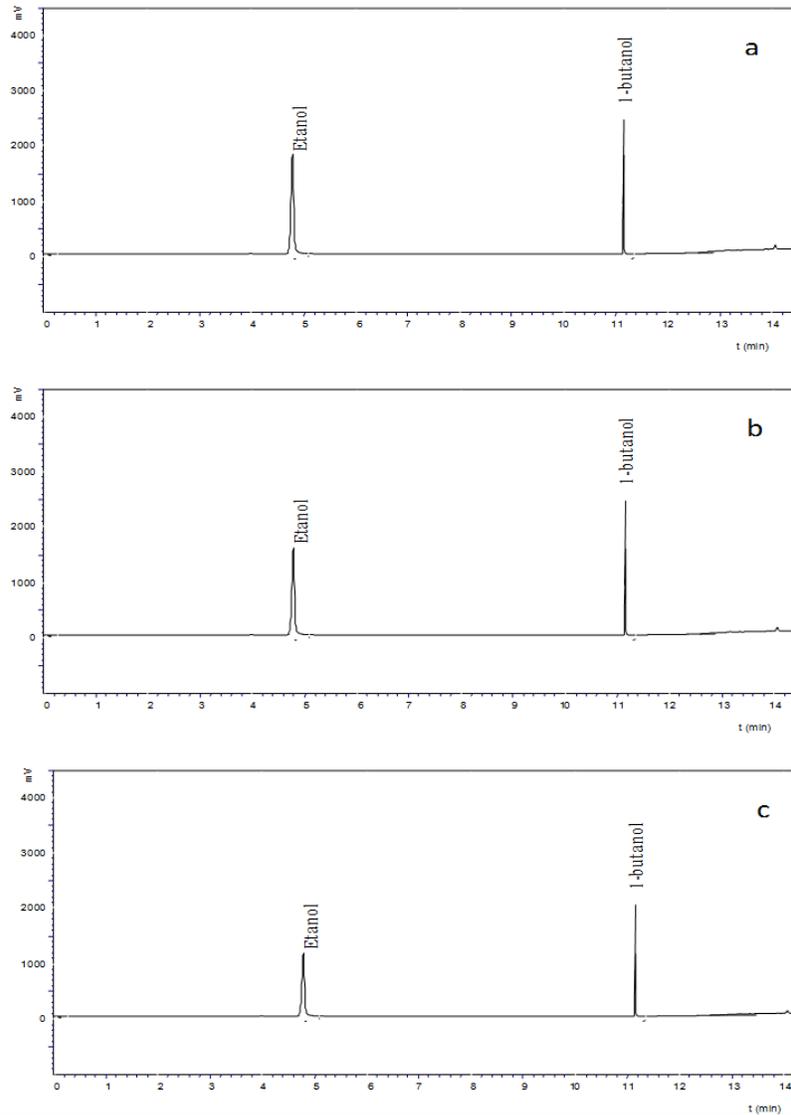


Figura 30. Cromatogramas GC-FID de los destilados obtenidos de medios de fermentación en ausencia (a) o presencia de 1% (b) y 2% (c) de NaCl utilizando la levadura *Saccharomyces bayanus* Fermiline Tipicity®.

De las pruebas realizadas con las levaduras *S. cerevisiae* marca Levapan® y *S. bayanus* marca Fermiline Tipicity® se puede indicar que en ninguno de los destilados obtenidos de las fermentaciones utilizando ambas levaduras se detectó metanol, por lo cual se puede considerar que ambas levaduras son seguras para la producción de etanol a partir de permeados concentrados de suero de quesería.

Capítulo V

Conclusiones

La investigación realizada en la presente tesis doctoral relacionada con la evaluación de permeados concentrados de suero de quesería como medio de fermentación para la producción de etanol alimentario ha alcanzado los objetivos propuestos y en base a los resultados obtenidos se formulan las siguientes conclusiones:

1. El diseño inicial de esta investigación, fundamentada en el aprovechamiento y caracterización por análisis experimental de sueros y permeados de sueros de quesería procedentes de Pasteurizadora Táchira C.A. (dulce de queso Blanco fresco, dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella), fue realizado tomando en cuenta cinco parámetros de composición (proteína, azúcares reductores, grasa, cloruros y pH) considerados importantes en estos subproductos para ser utilizados como medio de fermentación. Las características fisicoquímicas determinadas muestran que los sueros y permeados obtenidos de los sueros de quesería estudiados cumplen con los requerimientos necesarios (proteína residual, ricos en azúcares reductores y pH) para la preparación de un medio de fermentación para la producción de etanol.
2. Los permeados de sueros de quesería mayoritarios producidos en Pasteurizadora Táchira C.A. (dulce de queso Blanco fresco, dulce ligeramente salado de queso Blanco fresco y dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella) pueden mezclarse en diferentes proporciones para después ser procesados convenientemente por ultrafiltración, hidrólisis de la lactosa por acción de la enzima β -galactosidasa y concentración de los sólidos totales por evaporación, para obtener medios de fermentación ricos en azúcares reductores conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 1 y 2%, p/v), destacando el medio de fermentación sin NaCl elaborado con una mezcla de permeados de suero dulce ligeramente ácido de queso Mozzarella y permeado de suero dulce de queso Blanco fresco en proporción 85:15 (v/v), mezcla que es la más indicada para su utilización en la producción de etanol alimentario por su mayor producción en planta quesera y por su riqueza en azúcares reductores (31,56%, p/v).
3. El estudio preliminar realizado (1 producción con 2 réplicas) a partir del medio de fermentación seleccionado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 1 y 2%) y en

sinergia con las levaduras estudiadas, mostraron valores máximos de producción de etanol diferentes según el medio de fermentación y levadura utilizados, destacando el medio de fermentación sin adición de NaCl el que produce la mayor concentración de etanol en las tres levaduras analizadas, siendo *Saccharomyces cerevisiae* marca Levapan® y *Saccharomyces bayanus* marca Fermiline Tipicity® las que presentan un mayor consumo de azúcares reductores y por consiguiente la mayor producción de etanol, en comparación con *Kluyveromyces marxianus* ATCC® 36142™ que muestra, en las condiciones de fermentación ensayadas (fermentación estática de 200 mL, 32 ± 1 °C, 5 días), un bajo consumo de azúcares reductores y la menor producción de etanol.

4. Las pruebas finales de fermentación comparativas realizadas con *S. cerevisiae* y *S. bayanus* revelaron que, aunque la levadura *S. cerevisiae* fue la que presentó al quinto día de fermentación el mayor consumo de azúcares reductores y produjo la máxima cantidad de etanol, mostrando además los valores más altos en los parámetros cinéticos ensayados al utilizar los diferentes medios de fermentación (0, 1 y 2% de NaCl), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto a *S. bayanus* excepto cuando el medio fue adicionado de 1% de NaCl.
5. El efecto de la presencia de diferentes niveles de NaCl (1 y 2%) en el medio de fermentación sobre las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, evidencia que solo la inclusión del 2% de NaCl en el medio de fermentación produce de manera significativa una reducción en la producción de etanol, consumo de azúcares y parámetros cinéticos estudiados en el caso de *S. cerevisiae*, pero no para *S. bayanus* que ve afectada su producción de etanol a todas las concentraciones de NaCl estudiadas. Estos resultados indican la posibilidad de la inclusión en el medio de fermentación de los permeados dulces ligeramente salados de queso Blanco fresco producidos por Pasteurizadora Táchira C.A. en una proporción máxima del 5,3% (v/v) para alcanzar una concentración del 1% de NaCl, siendo en este medio la levadura más adecuada a utilizar *S. cerevisiae* por su mayor producción de etanol, en comparación con *S. bayanus*.
6. El análisis cromatográfico GC-FID realizado a los destilados obtenidos de las fermentaciones con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. bayanus* registraron la presencia de etanol en cantidad suficiente para comercializarlo, no evidenciándose la formación de

metanol, resultados que demuestran la calidad del destilado obtenido y el cumplimiento de la norma venezolana COVENIN (1997) respecto a este coproducto de fermentación en bebidas alcohólicas.

7. La aplicación industrial futura de los resultados obtenidos en este estudio en los procesos productivos de Pasteurizadora Táchira C.A. abre toda una serie de oportunidades a esta empresa láctea, ya que permitirá reducir el impacto ambiental al no verter los permeados de suero de quesería a la red de aguas residuales de la ciudad de San Cristóbal (Venezuela) evitando los consecuentes daños sobre las aguas del río Torbes; a la vez asegurará el aprovechamiento de un residuo con alto contenido de azúcares reductores y la obtención de etanol de grado alimenticio, transformando de esta manera los permeados de quesería en destilados ricos en etanol que serán utilizados para la elaboración de bebidas alcohólicas tradicionales venezolanas como el Ponche Crema, que es una mezcla de leche condensada azucarada y etanol de grado alimenticio. La incorporación de estos destilados en productos fabricados por Pasteurizadora Táchira C.A. fortalecerá a nivel económico y financiero la empresa al aprovechar estos desechos indeseables generando nuevos productos para la compañía.

Bibliografía

- Acevedo, D., Martínez, J.D., & Gómez, E.L. (2018). Determinación de la calidad nutricional del suero costeño y queso costeño de cabra usando ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). *Información Tecnológica*, 29(2), 215-224.
- Acosta, C. (2012). Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Universidad Nacional de Colombia.
<http://bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf/> Acceso 02 de Agosto del 2019.
- Acosta, A. (2015). Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4527/1/AGI-2015-002.pdf/> Acceso 02 Agosto del 2019.
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E., & Matsushita, K. (2003). New developments in oxidative fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 643-653.
- Aguilar-Uscanga, M.G., Delia, M.L., & Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(2), 157-162.
- Albertyn, J., Hohmann, S., & Prior, B.A. (1994): Characterization of the osmotic stress response in *S. cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol 3-phosphate dehydrogenase independently. *Current Genetics*, 25, 12-18.
- Alexandre, H., Ansana, Y., Galeote, V., Dequin, S., & Blondin, B. (2001). Global gene expression during short term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 498, 98-103.
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y Tecnología de la leche*. Zaragoza, Editorial Acribia.
- Antoni, D., Zverlov, W., & Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 23-35.
- Antunes, A.J. (2003). *Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino*. São Paulo, Brasil, Eds. Manole.
- Araujo, K., Páez, G., Mármol, Z., Ferrer, J., Ramones, E., Aiello Mazzarri, C., & Rincón, M. (2007). Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de β -D-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 30(1), 64-67.
- Araujo, K., Romero, A., Chirinos, P., Paéz, G., Mármol, Z., & Rincón, M. (2015). Producción de etanol a partir de suero de leche en cultivo por lote alimentado con ciclos repetidos. *Interciencia*, 40 (5), 305-310.
- Ariyanti, D., & Hadiyanto, H. (2013). Ethanol production from whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation System. Kinetics parameters estimation. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 7 (30), 179-194.
- Artica, L. (2014). *Métodos para el análisis físico químico de la leche y derivados lácteos*. Huancayo, Perú: @ Libros y editoriales, TEIA, Ltd.

- Astudillo, I.C. Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación. Universidad Nacional de Colombia. (2010). www.bdigital.unal.edu.co/.../isabelcristinapazastudillo.2009.pdf/ Acceso 28 de Julio del 2019.
- Audic, J.L., Chaufer, B., & Daufin, G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Le Lait*, 83(6), 417-438.
- Avalos, A.J. Elaboración de yogurt de leche de vaca con la adición de la enzima lactasa. Universidad Técnica de Ambato. (2003). <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3054> /Acceso 28 de Julio del 2019.
- Awad, S., Elhoda, N., & Morsi El Soda, A. (2013). Application of salt whey from Egyptian Ras cheese in processed cheese making. *Food and Nutrition Sciences*, 79-86.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Duenas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Alvarez-Caliz, C., & García-García, I. (2010). Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 908-912.
- Bai, F., Anderson, W., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89-105.
- Bansal, S., Oberoi, H.A., Dhillon, G.S., & Patil, R.T. (2008). Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β - galactosidase activity. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 337-341.
- Barba, D., Brandani, V., & di Giacomo, G. (1985). Hyperazeotropic ethanol salted-out by extractive distillation. Theoretical evaluation and experimental check. *Chemical Engineering Science*, 40(12), 2287-2292.
- Barros, M.R., Cabral, J.M., & Novals, J.M. (1987). Production of ethanol by immobilized *Saccharomyces bayanus* in an extractive fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(4), 1097-1104.
- Belem, M.A.F., & Lee, B.H. (2010). Production of bio ingredients of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: An alternative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(7), 565-598.
- Beney, L., de Marañón, I. M., Marechal, P., Moundanga, S., & Gervais, P. (2001). Osmotic destruction of *Saccharomyces cerevisiae* is not related to a high water flow rate across the membrane. *Biochemical Engineering Journal*, 9(3), 205-210.
- Bergamaschi, M., Cipolat-Gotet, C., Stocco, G., Valorz, G., Bazzoli, I., Sturaro, E., & Ramanzin, M. (2016). Cheesemaking in highland pastures: Milk technological properties, cream, cheese and ricotta yields, milk nutrients recovery, and products composition. *Journal Dairy Sciences*, 9631-9646.
- Beristain-Bauza, S.C., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 64-78.

- Blanco, M. R., Casado, F., Vázquez, J., & Pumar, M. (2006). CT y MR imaging findings in methanol intoxication. *American Journal of Neuroradiology*, 27, 452-454.
- Blomberg, A., & Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmo tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 87-92.
- Blomberg, A. (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaption to saline conditions: questions, some answers, and a model. *FEMS Microbiology Letters*, 182, 1-8.
- Bohlmann, G. Biobutanol, process economic program, review 2007-1. Sri. Consulting. (2007). https://ihsmarkit.com/pdf/RP264_toc_173658110917062932.pdf/ Acceso 18 d Julio de 2019.
- Bohorguez, D.L. Evaluación de la producción de Galacto-oligosacaridos (GOS) utilizando una β -galactosidasa a partir de lactosa de lactosuero. Universidad de Sucre. (2016). <https://repositorio.unisucre.edu.co/jspui/bitstream/001/581/1/T637.358%20B677.pdf/> Acceso 25 de Julio del 2019.
- Boontawan, P., Kanchanathawe, S., & Boontawan, A. (2011). Extractive fermentation of l-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique. *Biochemical Engineering Journal*, 54(3), 192-199.
- Breuning, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M., Bourgarel, D., Falcone, C., & Ferrero, L. (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microbiology Technology*, 26(9-10), 771-780.
- Bvv, R., Rao, M.N., Rao, M.D., Rao, S.S., & Ayyanna, C. (2003). Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5), 523-526.
- Callejas, J., Prieto, F., Reyes, V.E., Marmolejo, Y & Mendez, M.A. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fosforo. *Acta universitaria*, 22(1), 11-18.
- Calvacante, A.E., & Pastore, G.M. (2015). Galacto-oligosacáridos: produção, benefícios à saúde, aplicação em alimentos e perspectivas. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 69-81.
- Carbajal, A. Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid. (2013). <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/> Acceso: 28 de Julio del 2019.
- Cardenas, A.A. Empleo de una β -galactosidasa comercial de *kluyveromyces lactis* en la hidrólisis de lactosuero. Hechos microbiológicos. Universidad de Antioquia. (2012). <https://www.researchgate.net/publication/263543524/> Acceso: 12 Junio del 2018.
- Carvalho, F., Prazeres, A.R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater. Characterization and treatments. *Science of the Total Environment-Journal*, 445, 385-396.
- Cascone, R. (2008). Biobutanol-A Replacement for Bioethanol? *Chemical Engineering Progress*, 104(8), 54-59.
- Castellanos, J.L., Limón, A.B., & Hernández, A.R. (2009). Intoxicación por metanol, reporte de un caso. *Archivos de Medicina de Urgencia en México*, 1(2), 67-73.

- Castellar, R., Barros, M.R., Cabral, J.M.S., & Iborra, J.L. (1998). Effect of zeolite addition on ethanol production from glucose by *Saccharomyces bayanus*. *Journal Chemical Technology & Biotechnology*, 73, 377-384.
- Castrillo, J.L., & Ugalde, U.Q. (1993). Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 386-393.
- Castrillo, J.L., Kaliterna, J., Weusthuis, R.A, Van Dijken, J.P., & Pronk, J.T. (1996). High-cell density cultivation of yeasts on disaccharides in oxygen-limited batch cultures. *Bioethanol Bioengineering*, 49, 621-628.
- Chaucheyras, F.; Fonty, G.; Bertin, G., & Gouet, P. (1995). In vitro H₂ utilization by ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3466-3467.
- Chimbo, V.A. Producción de etanol a partir de suero de leche hidrolizada. Universidad de Azuay. (2015). <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/5070/> Acceso 28 de Julio del 2019.
- Choi, H., Laleye, L., Amantea, G., & Simard, R. (1996). Production of aminopeptidase from skim milk whey permeate medium by *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 956-963.
- Chongkhong, S., Lolharat, B., & Chetpattananondh, P. (2012). Optimization of ethanol production from fresh jackfruit seeds using response surface methodology. *Journal of Systems Engineering and Electronics*, 3, 97-101.
- Ciani, M., & Ferraro, L. (1997). Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(4), 489-495.
- Claasen, P.A.M., Van Lier, J.B., López-Contreras, A.M., Van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., & Weusthuis, R.A. (1999). Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(6), 741-755.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., & Brandelli, A. (2004). Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 21, 53-58.
- Condor. (2000). Recuperación de suero de quesería para la producción de una bebida alcohólica en un sistema en lote. *Anales Científicos UNALM*, 38, 90-106.
- Cot, M., Loret, M.O., Francois, J., & Benbadis, I. (2007). Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Research*, 7, 22-32.
- Coton. (1980). Whey technology - the utilization of permeates from the ultrafiltration of whey and skim milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 33(3), 89-94.
- Cooney, C.L. (1983). *Bioreactors: Design and Operation*. Science, 219(4585), 728-733.
- Cuartas, B.E. Estudio del proceso de nanofiltración para la desmineralización de lactosuero dulce. (2005). Universidad Politécnica de Valencia.

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1878/tesisUPV2361.pdf/> Acceso 28 de Julio del 2019.

COVENIN. (1979). Norma Venezolana COVENIN 1315-79, Alimentos. Determinación de pH (acidez ionica). 1ra revisión. Caracas, Venezuela.

COVENIN. (1982). Norma Venezolana COVENIN 369-82, Leche fluida. Determinación de cloruros. 1ra revisión. Caracas, Venezuela.

COVENIN. (1982). Norma Venezolana COVENIN 1053-82, Leche fluida. Determinación de grasa. Método de Gerber. 1ra revisión. Caracas, Venezuela.

COVENIN. (1990). Norma Venezolana COVENIN 1337-90, Alimentos. Método para recuento de mohos y levaduras. Caracas, Venezuela.

COVENIN. (1994). Norma Venezolana COVENIN 3107-94, Azúcar. Determinación de azúcares reductores. 1ra revisión. Caracas, Venezuela.

COVENIN (1994). Norma Venezolana 798-94, Leche Pasteurizada (2da revisión). Caracas, Venezuela.

COVENIN (1997). Norma Venezolana 3340, bebidas alcohólicas. Caracas, Venezuela.

COVENIN (2001). Norma Venezolana 3662, Cocuy Pecayero. Caracas, Venezuela.

Dale, M.C., Eagger, A., & Okos, M.R. (1994). Osmotic inhibition of free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* anaerobic growth and ethanol productivity in whey permeate concentrate. *Process Biochemistry*, 29, 535-544.

Das, M., Raychaudhuri, A., & Ghosh, S.K. (2016). Supply chain of bioethanol from whey: a review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 833–846.

Dash, P.K., Mohaptra, S., Swain, M.R., & Thatoi, H. (2017). Optimization of bioethanol production from saccharified sweet potato root flour by co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia* sp. Using OVAT and response surface methodologies. *Acta Biologica Szegediensis*, 6(1), 13-23.

De Wit, J.N. (2001). *Lecturer's Handbook on whey and whey products*. European Whey Products Association, Brussels, Belgium.

Degree, R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed.: G.H. Fleet. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 421-447.

Delaney, R.A.M. (1981). Recent development in the utilization of whey. *American Cultured Dairy Products Institute*, 16, 11-22.

Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.L., & Le Jeune, C. (2004). Predominio de *Saccharomyces uvarum* durante la fermentación alcohólica espontánea, durante tres años consecutivos, en una bodega alsaciana. *Journal Applied and Microbiology*, 97(6), 1140-1148.

Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J.L., Barral, M.T., Cruz, J.M., & Moldes, A.B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*; 31, 2327-2335.

- Dinitz, R., Rodriguez, M., Fietto, L., Passos, F., & Silveira, W. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 111-117.
- Dmitrieva, I., Maurice, N., & Burg, B. (2005). Hypertonic stress response. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Mutation Research*, 569, 65-74.
- Dolmar Living Innovation. Ficha técnica levadura *Saccharomyces bayanus* Fermiline Tipicity. (2018). <https://www.e-dolmar.com/> Acceso 28 de Julio del 2019.
- Domingues, L., Teixeira, J.A., & Lima, N. (1999). Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 621-626.
- Domingues, L., Lima, N., & Teixeira, J.A. (2001). Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(5), 507-514.
- Domingues, L., Teixeira, J.A., Penttila, M., & Lima, N (2002). Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting high levels of *Aspergillus niger* β -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 645-650.
- Domingues, L., Lima, N., & Texeira, J.A. (2005). *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. *Journal Process Biochemistry*, 40, 1151-1154.
- Doyle, A. Another step in biofuel supply. Irish farmers Journal interactive. (2005). <http://www.farmersjournal.ie/72005/1008/farmmanagement/crops/index.shtml/> Acceso 11 de Febrero de 2018.
- Dragone, G., Mussatto, J.M., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A. (2009). Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by fermentation of cheese whey. *Food Chemistry*, 112(4), 929-935.
- Dragone, G., Mussatto, S., Oliveira, J., & Teixeira, J. (2011). Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112(4), 929-935.
- Drapcho, C. M., Nghiem, N. P., & Walker, T. (2008). *Biofuels engineering process technology*. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Eldeleklioglu, B., Bayraktar, E., & Mehmetoglu, U. (2013). The effects of nutrient supplements on the production of lactic acid from cheese whey. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, 38, 81-91.
- Enríquez, M., & Acevedo, A. (2012). Identificación molecular de levaduras presentes durante la fermentación de Sotol. Universidad Juárez. www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/674/.../6. Acceso 21 de Agosto del 2019.
- Ergüder, T.H., Tezel, U., Güven, E., & Demirer, G.N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Manage*, 21 (7), 643-650.
- Ezeji, T.C., Blaschek, H.P., & Qureshi, N. (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Journal Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 220-227.

- Ezeji, T.C., Qureschi, N., & Blaschek, H.P. (2013). Microbial production of a biofuel (acetone–butanol–ethanol) in a continuous bioreactor: impact of bleed and simultaneous product removal. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(1), 109-116.
- Fajardo, E. E., & Sarmiento, S.C. (2007). Evaluación de la mezcla de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana, Microbiología industrial. <http://hdl.handle.net/10554/8279>. Acceso 16 de Junio 2018.
- FAO. (2019). Food Outlook, biannual report on global food market, Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/CA4526EN/CA4526EN.pdf/> Acceso 4 de Julio de 2019.
- Farahnak, F., Seki, T., Ryu, D.D., & Ogrydziak, D. (1986). Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Applied Environmental Microbiology*, 51(2), 362-367.
- Farizoglu, B., Keskinler, B., Yildiz, E., Nuhoglu, A. (2007). Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR). *Journal Hazard Mater*, 146(1-2), 399-407.
- Fernandes Silva, M., Fornari, C.J., Mazutti, M., Oliveira, D., Ferreira Padilha, F., Cichoski, A.J., Cansian, R.J., Di Luccio, M., & Treichel, H. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90, 119-123.
- Fischbach, G. (1987). Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry. Christian-Albrechts-Universität. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-35766-9.pdf> /Acceso 28 de Julio del 2019.
- Fleet, G.H., & Heard, G.M. (1993). Yeast-Growth during Fermentation. In: Fleet, G.H., (Eds.), *Wine, Microbiology and Biotechnology* (pp. 27-54.). Lausanne: Harwood academic Publishers.
- Flickinger, M., & Drew, S.W. (1999). *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Eds.). (Vols. 1-5). New Jersey: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Inc.
- Foegeding, E., & Luck, P. (2002). Whey protein products. In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. (pp. 1957-1960). New York: Academic Press.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), 24-46.
- Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79 (3), 339-354.
- Frigon, J.C., Bruneau, T., Moletta, R., & Guiot, S.R. (2007). Coupled anaerobic aerobic treatment of whey wastewater in a sequencing batch reactor: proof of concept. *Water Science and Technology*, 55 (10), 201-208.

- Fukuda, H., Kondo, A., & Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 2-12.
- Gabardo, S., Rech, R., Rosa, C.A., & Zachia, M.A. (2014). Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renewable Energy*, 69, 89-96.
- Gamarra-Ballena, G., & Woolcott-Hurtado, J.C. (2000). Optimización de las condiciones fermentativas para la producción y extracción de β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus*. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 3(1), 14-22.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361.
- Ganju, S., & Gogate, P.R. (2017). A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, 215, 84-96.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A., & Gómez, E. (2000). Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Journal of Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.
- Garman, J., Coolbear, T., & Smart, J. (1996). The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(1), 22-27.
- Gawel, J., & Kosikowski, F.V. (1978). Improving alcohol fermentation in concentrated ultrafiltration permeates of cottage cheese whey. *Journal of Food Science*, 43, 1717-1719.
- Ghaly, G., Kamal, M., & Correia, L. (2005). Kinetic modeling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology*, 96(10), 1143-1152.
- Gernigon, G., Piot, M., Beaucher, E., Jeantet, R., & Schuck, P. (2009). Physicochemical characterization of Mozzarella cheese wheys and stretch waters in comparison with several other sweet wheys. *Journal of Dairy Science*, 92, 5371-5377.
- Goffrini, P., Ferrero, I., & Domini, C. (2002). Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts a determinant role for sugar transporters. *Journal of Bacteriology*, 184, 427-432.
- Gökgöz, M., & Yiğitoğlu, M. (2013). High productivity bioethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces bayanus* onto carboxymethylcellulose- γ -poly(Nvinyl-2-pyrrolidone) beads. *Artificial Cells, Nanomedicine & Biotechnology*, 41(2), 137-143.
- González Siso, M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11.
- González, M.I., Álvarez, S., Riera, F., & Álvarez, R. (2007). Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 553-561.
- Grba, S., Tomas, V. S., Stanzer, D., Vahcic, N. & Skrlin, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 13-16.

- Grubb, C.F., & Mawson, A.J. (1993). Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnology Letters*, 15, 621-626.
- Guerrero-Haber, J.R., Ramirez-Peru, A.L & Puente-Vidal, W. (2011). Caracterización del suero de queso blanco del combinado lácteo Santiago. *Tecnología Química*, 31(3), 93-100.
- Guimarães, P.M.R., Francois, J., Parrou, J.L., Texeira, J.A., & Domingues, I. (2008a). Adaptive evolution of a lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1748-1756.
- Guimarães, P.M.R., Texeira, J.A., & Domingues, I. (2008c). Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 30, 1952-1958.
- Guimarães, P.M.R., Texeira, J.A., & Domingues, I. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384.
- Guinee, T., & Fox, P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. In P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee (Eds). *Major Cheese Groups*, 2, (pp. 1-434). London: Elsevier.
- Gunasekaran, S., & Ko Xiao, L. (2007). Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 31-40.
- Guzman, A.M., Santiago, P.A., & Lopez, M.A. (2009). Compuestos volátiles aromáticos durante la elaboración del mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 273-279.
- Hadiyanto, H., Ariyanti, D., Aini, P.A., & Pinundi, D.S. (2014). Optimization of ethanol production from whey trough fed-batch fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Procedia*, 47(1), 108-112.
- Halimatun, S.H., Nor'Aini, A.R., Umi, K.M.S., & Azhari, S.B. (2015). Enhanced fermentable sugar production from kitchen waste using various pretreatments. *Journal Environmental Management*, 156, 290-298.
- Hamadi, S., Muruke, M.H., & Hosea, K.M.M. (2014). Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from coffee pulp waste using *Pichia anomala* M4 yeast isolated from coffee environment in Tanzania. *International Journal Environmental Science*, 4, 255-262.
- Hahn-Hägerdal, B. (1985). Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with β -galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(6), 914-916.
- Harju, M., Kallioinen, & Tossavainen, H. (2012). Lactose Hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104-109.
- Henley, J.P., & Sadana, A. (1984). Mathematical analysis of enzyme stabilization by a series-type mechanism: influence of chemical modifiers. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(8), 959-969.

- Hicks, J. J. (2001). *Bioquímica* (9a edición). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana S.A.
- Hocking, A.D. (1993). Responses of Xerophilic fungi to changes in water activity. In Jennings, D.H. (eds.), *Stress Tolerance of Fungi* (pp.233-255). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hohmann, S., & Mager, W. (1997). Shaping up: The responses of yeast to osmotic stress. In S. Hohmann and W. Mager (Eds.), *Yeast stress responses* (pp 101-146). London: Chapman & Hall.
- Hough, J.S. (1990). *Biología de la cerveza y la malta*. Zaragoza: Ed. Acribia S.A.
- Hounsa, C. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 144(3), 671-680.
- Huerta, L., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes A. (2011). Synthesis of galactooligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 46(1), 245-252.
- Hwan Seo, Y., Park, G., & Han, J. (2015). Efficient lactulose production from cheese whey using sodium carbonate. *Food Chemistry*, 173, 1167-1171.
- IWSR. 2018-2022 Pronóstico: Volumen y Datos. (2018). <https://www.theiwsr.com/> Acceso 24 de Julio del 2019.
- Janssens, J.H., Burris, N., Woodward, A., & Balley, R.B. (1983). Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragiles*. *Applied Environmental Microbiology*, 45, 598-602.
- Jiménez-Martí, E., Gomar-Alba, M., Palacios, A., Ortiz-Julien, A., Del Olmo, M.L. (2011). Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must: relevance of the osmotic stress response. *Applied Microbiology Biotechnology*, 89(5), 1551-1561.
- Jonggeon, J., Nam, W. O., & Kew, H. L. (2000). Preparation and characterization of PVA/SA composite nanofiltration membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(2), 347-354.
- Jovanovic, S., Barac, M., & Macej, J. (2005). Whey proteins properties and possibilities of application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.
- Juca, R.D., & Pérez, A.P. Determinación de lactosa en leche deslactosada y su comparación con la fórmula aplicada en la empresa de lácteos San Antonio. Repositorio Institucional. Universidad de Cuenca. (2010). <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2427/> Acceso 24 de Julio del 2018.
- Kapoor, R., & Metzger, L. E. (2004). Evaluation of salt whey as an ingredient in processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 87(5), 1143-1150.
- Kargi, F., & Ozmihci, S. (2006). Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: effects of operating parameters. *Enzyme Microbiology Technology*, 38(5), 711-718.
- Kessler, H.G. (1996). *Food and bioprocess engineering. Dairy technology*. (4th edition). Munich: Verlag A. Kessler.

- Kindstedt, P.S., & Kiely, L.I. (1992). Revised protocol for the analysis of Mozzarella cheese. *Journal Food Science*, 56, 1115-1116.
- Kiran, E.U., Trzcinski, A.P., Ng, W.J., & Liu, Y. (2014). Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. *Waste Biomass Valorization*, 5(6), 903–917.
- Klaassen, C. D., & Watkins III, J. B. (2013). *Manual de Toxicología (5a edición)*. México D.F: McGraw-Hill.
- Kourkoutas, Y., Dimitropoulou, S., Kanellaki, M., Marchant, R., Nigam, P., Banat, I.M., & Koutinas, A.A., (2002a). High temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresource Technology*, 82(2), 177-181.
- Koushki, M., Jafari, M., & Azizi, M. (2012). Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeasts strains. *Journal of Food Science and Technology*, 59(5), 614-619.
- Kumar, V., Ramakrishnan, S., Teeri, T.T., Knowles, J.K.C., & Hardey, B.S. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* β -galactosidase grow on whey permeate. *Biotechnology*, 10(1), 82-85.
- Kumar, M., & Gayen, K. (2011). Developments in biobutanol production: new insights. *Journal Applied Energy*, 88(6), 1999-2012.
- Kurtzman, C.P., & Fell, J.W editors. (1998). *The yeasts a taxonomic study (4th edition)*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Lachance, M.A. (1998). *Kluyveromyces van der Walt*. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W (Eds). *The yeasts a taxonomic study*. (pp. 227-247). Amsterdam: Elsevier.
- Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(10), 1497-1501.
- Leizaola, F. (2011). Suero y requesón, productos poco valorados por los pastores vascos. *Biblid*, 34, 517-528.
- Leveau, Y., & Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial, los microorganismos de interés industrial*. (1a edición). Zaragoza: Eds. Acribia S.A.
- Lewis, M., & Young, T. (2002). *Brewing*. (2^a edition). New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- Lin, Y., Zhang, W., & Li, C. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomasa y Bioenergía*, 47, 395-401.
- Lindquist, S. (1992). Heat shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2(5), 748-755.
- Ling, K.C. Whey to ethanol: a biofuel role for dairy cooperatives? *Rural development*. (2008). <http://www.rurdev.suda.gov/RBS/pub/RR214.pdf/> Acceso 24 de Julio de 2018.
- Liu, J., & Fan, L.T. (2004). Downstream process synthesis for biochemical production of butanol, ethanol, and acetone from grains: generation of optimal and near optimal flowsheets with conventional operating units. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1518-1527.

- Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308), *Bioresource Technology*, 99(4), 847-854.
- Liu, C., Wang, F., & Ou-Yang, F. (2009). Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresource Technology*, 100, 878-882.
- Logothetis, S., Walker, G., & Nerantzis, E. (2007). Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability. *Matrica Srpska Novi Sad*, 113, 271-284.
- Ma, H.Z., Wang, Q.H., Zhang, W.Y., Xu, W.L., & Zou, D.X. (2008). Optimization of the medium and process parameters for ethanol production from kitchen garbage by *Zymomonas mobilis*. *International Journal Green Energy*, 5(6), 480-490.
- Ma, H., Jian, Y., Yan, J., Wang, Q., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2016a). Stillage reflux in food waste ethanol fermentation and its by-product accumulation. *Bioresource Technology*, 209, 254-258.
- Ma, K.D., Zhiyong, R., Shui, Z.X., Wang, Y.W., Hu, G.Q., & He, M.X. (2016b). Open fermentative production of fuel ethanol from food waste by an acidtolerant mutant strain of *Zymomonas mobilis*. *Bioresource Technology*, 203(7), 295-302.
- Mahmoud, M.M., & Kosikowski, F.V. (1982). Alcohol and single cell protein production by *Kluyveromyces* in concentrated whey permeates with reduced ash. *Journal Dairy Sciences*, 65, 2082-2087.
- Mahoney, R.R. (1997). Lactose: Enzymatic Modification. In: Fox P.F. and P. McSweeney (Eds). *Advanced Dairy Chemistry* (pp 77-125). London: Elsevier.
- MarelneCot, M., Loret, M.O., & Francois, J. (2007). Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Research*, 7(1), 22-32.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9(2), 135-136.
- Man, H.L., Behera, S.K., Park, H.S. (2010). Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(1), 157-164.
- Matsushita, K., Toyama, H., & Adachi, O. (2004). Respiratory chains in acetic acid bacteria: membrane bound periplasmic sugar and alcohol respirations. In: Davide Zannoni (Eds.). *Respiration in Archaea and Bacteria advances in photosynthesis and respiration* (pp. 81-99). Dordrecht: Springer.
- Mawson, J. (2003). Fermentation of Whey. In: Caballero, B. (Ed.). *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition* (pp. 6157-6163). London: Academic Press.
- Mehaia, M.A., & Cheryan, M. (1990). Ethanol from hydrolyzed whey permeate using *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane recycle bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 5(2), 57-61.
- Meirelles, A., Weiss, S., & Herfurth, H. (1992). Ethanol dehydration by extractive distillation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 53(2), 181-188.

- Mendes da Silva, L. (2011). Potential applications of whey proteins in the medical field. In J.S. Reis, J.A. Texeira (Eds), Engineering aspects of milk and dairy products (pp 251-252). Braga: Taylor & Francis.
- Merck Millipore. Ficha de datos de seguridad furfural de acuerdo al reglamento (CE) No. 1907/2006. (2017). <http://www.merckmillipore.com/.../ShowDocument-File+furfural/> Acceso 15 de Junio del 2019.
- Merico, A., Galafassi, S., Piskur, J., & Compagno, C. (2009). The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research, 9(5), 749-756.
- Mesas, J.M., & Alegre, M.T. (2009). El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. CYTA - Journal of Food, 2(4), 174-183.
- Miller J. N., & Miller J. C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica (4^a edición). Madrid: Editorial Prentice Hall.
- Modig, T., Granath, K., Adler, L., & Lidén, G. (2007). Anaerobic glycerol production by strains of *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic stress. Applied Microbiology and Biotechnology, 75(2), 289-296.
- Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorization of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. In Innocenzo Muzzalupo (Eds.), Food Industry (pp. 549-587). London: Intech Open Science.
- Moawad, E.Y. (2012). Optimizing bioethanol production by regulating yeast growth energy. Systems and Synthetic Biology, 6(3-4), 61-68.
- Moon, H.C., Song, I.S., Kim, J.C., Shirai, Y., Dong, H.L., & Kim, J.K. (2010). Enzymatic hydrolysis of food waste and ethanol fermentation. International Journal of Energy Research, 33(2), 164-172.
- Mostafa, N.A. (2001). Producción de ácido acético y glicerol a partir de suero de leche con sal y se secó en una membrana de reciclaje celular biorreactor. La conversión y gestión de energía, 42, 1133-1142.
- Muñi, A., Páez, G., Faria, J., Ramones, E., & Ferrer, J. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración / nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. Revista científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad del Zulia, 15(4), 361-367.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Marzocchella, A., & Salatino, P. (2012). Optimization of solvent recovery in the production of butanol by fermentation. Environmental Engineering and Management Journal, 11(8), 1499-1504.
- National Cancer Institute. Alcohol y el riesgo de cáncer. (2018). www.cancer.gov/espanol/ Acceso 05 de Julio del 2019.
- Naumova, E.S., Naumov, G.L., Masneuf-Poma, I., Aigle, M., & Dubourdiou, D. (2005). Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. Yeast, 22, 1099-1115.

- Naumov, G.J., Naumova, E.S., Masneuf, J., Belarbi, A. (2001). Genetic identification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 108-111.
- Naumov, G.I., Nguyen, V., Naumova, E. S., Michel, A., Aigle, M., & Gaillardin, C. (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, acider-fermenting yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 163-171.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Antunovics, A., & Sipiczki, M. (2002). *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* en Tokaj vinificación de Eslovaquia y Hungría. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 727-730.
- Neto, C.A., Oliveira, E., Lacerda, V., Castro, E., Romao, A., Silva, R., Pereira, R., Sten, T., Filgueiras, P., & Poppi, R. (2014). Quality control of ethanol fuel: Assessment of adulteration with methanol using H NMR. *Fuel*, 135, 387-392.
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). *Bioreaction engineering principles*. New York: Plenum Publishers.
- Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A., Biria, D., & Doostmohammadi, M. (2015). Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 453-460.
- Norton, S., Lacroix, C., & Vuilleumard, J.C. (1994). Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(6), 457-66.
- NTE INEN (2015). Norma Ecuatoriana 1837, Bebidas alcohólicas. Licores. Requisitos. Quito. Ecuador.
- Oda, Y., & Tonomura, K. (1993): Sodium chloride enhances the potential leavening ability of yeast in dough. *Food Microbiology*, 10(3), 249-254.
- OECD-FAO: (2017). *OECD-FAO Perspectivas Agrícolas 2017–2026*, Editions OCDE, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-es / Acceso: 05 de Julio del 2019.
- Oenofrance. *Selectys la bayanus: levadura para un desarrollo seguro de la fermentación alcohólica*. (2018). <https://www.oenofrance.com/es/.../levaduras/selectys-la-bayanus.pdf>/ Acceso 28 de Julio del 2019.
- O'leary, V.S., Green, R., Sullivan, B.C., Holsinger, V.H. (1977). Alcohol production by selected yeast strains in lactase-hydrolyzed acid whey. *Biotechnology and Bioengineering*, 19(7), 1019-1035.
- Oliveira, B.M., Barrio, E., Querol, A., & Pérez-Torrado R. (2014). Actividad enzimática mejorada de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de la *Saccharomyces kudriavzevii* criofílico. *Plos One*, 9(1), 1-12.
- Ordoñez, C. (1998). *Tecnología de los Alimentos, volumen II: Alimentos de origen animal*. Madrid: Síntesis S.A.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007a). Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese whey powder (CWP) solution. *Letters Applied Microbiology*, 44(6), 602-606.

- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007b). Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(2), 79-86.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007c). Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 876-880.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007d). Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-bath operation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 169-174.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2008). Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 180-185.
- Panesar, P., Kennedy, D., Ghandi, D & Benko, K. (2007): Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1), 1-14.
- Parra, A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 62(1), 4967-4982.
- Parashar, A., Jin, Y., Mason, B., Chae, M & Bressler, D. C. (2016). Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 99, 1859-1867.
- Pattnaik, R., Yost, R.S., Porter, G., Masunaga, T., & Attanandana, T. (2007). Improving multi-soil-layer (MSL) system remediation of dairy effluent. *Ecological Engineering*, 32(1), 1-10.
- Pereira, P.F., Sousa, R.M.F., Munoz, R.A.A., & Ritcher, E.M. (2013). Simultaneous determination of ethanol and methanol in fuel ethanol using cyclic voltammetry. *Fuel*, 103, 725-729.
- Perez-Torrado, R., Oliveiro, B., Zemancikova, J., Sychrova, H. (2016). Alternative glicerol balance strategies among *Saccharomyces* species in response winemaking. *Frontiers in Microbiology*, 7, 435.
- Pescumma, M., Hérbet, E., Mozzi, F., & Font, G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 25(3), 442-451.
- Pesta, G., Meyer-Pitroff, R., & Russ, W. (2007). Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. In: Oreopoulou, V & W Russ (eds.). New York: Springer.
- Phisalaphong, M., Srirattana, N., & Tanthapanichakoon, W. (2006). Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Journal Biochemical Engineering*, 28(1), 36-43.
- Phutela, U.G., & Kaur, J. (2014). Process optimization for ethanol production from sweet sorghum juice using *Saccharomyces cerevisiae* strain NRRL Y-2034 by response surface methodology. *Sugar Technology*, 16(4), 411-421.
- Pintado, M.E., Macedo, A.C., & Malcata, F.X. (2001). Review: Technology, Chemistry and Microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 105-116.

- Pisponen, A.S., Pajumagi, H., Mootse, A., & Karus, A. (2013). The lactose from cheese whey. The effect of pH and concentration of lactose crystals. *Dairy Science Technology*, 477-486.
- Porro, D., Martegani, E., Ranzi, B.M., & Alberghina, L. (1992). Lactose/whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(8), 799-805.
- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology-from a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18(7), 735-740.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta disponibilidad. *Revista Chilena de nutrición*, 40(4), 397-403.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Puente, S.D. Elaboración de una bebida alcohólica a partir de suero de leche dulce proveniente de queso fresco y mora (*rubus glaucus benth*). Universidad de Las Américas. (2018). <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/9541/> Acceso 08 de Abril del 2019.
- Qi, P. X., & Onwulata, C. I. (2011). Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2231-2244.
- Quintero, H., Rodríguez Marval, M., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Rincón, M. (2001). Producción de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir del suero de leche. *Revista Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 9, 87-94.
- Quirós, M., Rojas, V., González, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85-91.
- Raganati, F., Olivieri, G., Procentese, A., Russo, M.E., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2013). Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresource Technology*, 138, 259-265.
- Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., & Kishore, V.V.N. (2000). State of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable Sustainable Energy*, 4 (2), 135-156.
- Rajoka, M.I., Khan, S., & Shahid, R. (2003). Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. *Food Technology and Biotechnology*, 41(4), 315-320.
- Ramirez-Navas, J.S. (2012). Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 6, 69-83.
- Ramírez, M. A., & Rivas, N. (2003). Producción y caracterización parcial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(2), 194-201.

- Rana, S., Tiwari, R., Arora, A., Singh, S., Kaushik, R., Saxena, A.K., Dutta, S.C., Nain, L. (2013). Prospecting *Parthenium* sp. pretreated with *Trametes hirsuta*, as a potential bioethanol feedstocks. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 152 -158.
- Rapin, J.D., Marison, I.W., Von stockar, U., & Reilly, P.J. (1994). Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 143-150.
- Rementería, A., Rodríguez, J.A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J.R., & Hernando, F.L. (2003). Levadura asociada a fermentaciones espontáneas de vinos blancos de la región 'Txakoli de Bizkaia' País Vasco, norte de España. *Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 201-207.
- Remize, F., Barnavon, L., & Dequin, S. (2001). La exportación de glicerol y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, pero no la glicerol fosfatasa, limitan la velocidad de producción de glicerol en *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 3(4), 301-312.
- Risner, D., Shayevitz, A., Haapala, K., Meunier-Goddik, L., Hughes, P. (2018). Fermentation and distillation of cheese whey: Carbon dioxide-equivalent emissions and water use in the production of whey spirits and white whiskey. *Journal Dairy Sciences*, 101(4), 2963-2973.
- Rivas, J., Prazeres, A.R., & Carvalho, F. (2011). Aerobic biodegradation of precoagulated cheese whey wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2511 -2517.
- Rivera, W.Z., Rodríguez, P.E., & González, E.W. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 151-160.
- Rodríguez, G. 2014. Curso de análisis instrumental de productos agrícolas. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú. <https://es.slideshare.net/vegabner/determinacin-de-alcoholes-por-cromatografa-de-gases-41437838> Acceso 24 de Mayo de 2016.
- Rojas, A.M., Montañol, L.P., Bastidas, M.J. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5-10.
- Roukas, T., & Lazarides, H.N. (1991). Ethanol production from desproteinized whey by β -galactosidase coinmobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 7(1), 15-18.
- Rushe, E. La mejor Ginebra de Irlanda está hecha con leche. (2016). <https://munchies.vice.com/es/> Acceso 01 Enero 2018.
- Saavedra, A., & Romero, J. (1999). Aspectos generales sobre procesos y tecnologías de membranas. Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile. <http://ambiente.usach.cl/jromero/imagenes/GUIAS%20MEMBRANA/Documento%204.%20Sintesis%20y%20caracterizacion%20de%20membranas%20UF.pdf>/Acceso 18 de Mayo del 2019.
- Saeed, M.A., Ma, H., Yue, S., Wang, O., & Tu, M. (2018). Concise review on ethanol production from food waste: development and sustainability. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 28851-28863.

- SACS. (2017). Providencia Administrativa Nro. 266, Requisitos de calidad e inocuidad e inocuidad de la bebida alcohólica autóctona denominada “Cocuy”. <http://sacs.gob.ve/site/images/normativa/providencias/266.pdf/> Acceso 28 de Julio del 2019.
- Sánchez, O., & Cardona, C. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270-5295.
- Sansoneti, S., Hobley, T.J., Calapro, V., & Villandsen, G. (2011). A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*. A batch fermentation and kinetic study. *Bioresources Technology*, 7513-7520.
- Schumann, C. (2002). Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41(1), 17-25.
- Sen, B., Aravind, J., Kanmani, P., & Chyihow, L. (2016). State of the art and future concept of food waste fermentation to bioenergy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 547-557.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology*, 165, 1-52.
- Silva, A.C., Pontes, L.F., Pimentel, M.F., & Pontes, M.J. (2012). Detection of adulteration in hydrated ethyl alcohol fuel using infrared spectroscopy and supervised pattern recognition methods. *Talanta*, 93, 129-134.
- Silveira, W.B., Passos, F.J.V., Mantovani, H.C., & Passos, F.M.L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme & Microbial Technology*, 36, 930-936.
- Singh, R.K., & Ghaly, A.E. (1984). Single cell protein production from cheese whey. *ASAE Paper*, 6528.
- Smithers, G.W. (2008). Whey and whey proteins - from “gutter to gold”. *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.
- Snoek, I.S., & Steensma, H.Y. (2006). Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. *Federation of European Microbiological Societies in Yeast Research*, 6(3), 393-403.
- Soriano, S., Flores, L., Davila, P., Cervantes, G., & Sonia, A. (2012). Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Annals of Microbiology*, 62, 313-317.
- Spălățelu, C. (2012). Biotechnological valorization of whey. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 1-8.
- Sreekrishna, K., & Dickson, R.C. (1985). Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 7909-7913.
- Staniszewski, M., Kujawski, W., & Lewandowska, M. (2007). Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative

recovery of product - Kinetic model predictions. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 618-625.

Tahir, A., Aftab, M., & Farasat, T. (2010). Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Saccharomyces cerevisiae* BIO-7. *Journal of Applied Pharmacology*, 3(2), 72-78.

Tait, K. (1995). *Industria farmacéutica. Enciclopedia de la salud y seguridad en el trabajo.* (3a edición). Ginebra: Organización Internacional del Trabajo.

Tang, Y.Q., Koike, Y., Liu, K., An, M.Z., Morimura, S., & Wu, X.L. (2008). Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain kf-7. *Biomass Bioenergy*, 32(11), 1037-1045.

Tango S., & Ghaly A. (1999). Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and Bioenergy*, 17(3), 221-238.

Tekolo, O. (2010). The osmotic stress tolerance of Basidiomycetous yeasts. *Federation of European Microbiological Societies in Yeast Research*, 10(4), 482-491.

Tellez-Mora, P., Peraza-Luna, F.A., Tenia-Velazco, A., & Andrade-Gonzalez, J. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 163-176.

Tetra Pak Processing System. (2003). *Manual de Industrias Lácteas.* (3a Edición). Madrid: AMV Ediciones-C.

Thiele, J.H. Estimate of the energy potential for fuel ethanol from putrescible waste in New Zealand. Dumedin: Waste solutions Ltd. (2005). <http://www.bioenergy.org.nz/documents/liquid/fuels/energy-potential-for-fueñ-ethanol-from-putrscible-wastw-in-nz-report-05/> Acceso 2 Junio de 2019.

Togarepi, E. (2012). Optimization of fermentation parameters for ethanol production from *Ziziphus mauritiana* fruit pulp using *Saccharomyces cerevisiae* (NA33). *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 2(2), 60-69.

Tomaszewska, M., & Białończyk, L. (2016). Ethanol production from whey in a bioreactor coupled with direct contact membrane distillation. *Catalysis Today*, 268, 156-163.

Torres, C. Mercadeo, producción y lanzamiento de una fragancia fina para Luis Palacios, en el segmento hombres de 25 a 35 años, en la ciudad de Bogota D.C. Universidad Javeriana. (2004). <https://text-mx.123dok.com/document/nq76lmry-mercadeo-produccion-y-lanzamiento-de-una-fragancia-fina-para-luis-palacios-en-el-segmento-hombres-de-25-a-35-anos-en-la-cuidad-de-bogota-d-c.html/> Acceso 04 de Julio del 2019.

Tortora, G. J., Funke, B., & Case, L. (1986). *Microbiology: An introduction Brief.* (10 edition). San Francisco: CA Pearson Benjamin Cummings.

Tovar, X.J. (2012). Traditional methods for whey protein isolation and concentration. Effects on nutritional properties and biological activity. *Journal Mexican Chemical Society*, 369-377.

- Toyoda, T., & Ohtaguchi, K. (2008). Production of Ethanol from Lactose by *Kluyveromyces lactis* NBRC 1903. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 13, 30-35.
- Tretiak, K.A., Zakal'skii, A.E., Gudz', S.P. (1998). The cloning and expression of the gene for β -galactosidase from *Candida pseudotropicalis* yeasts in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 60, 57-66.
- Treybal, R.E. (2001). *Operaciones de transferencia de masa*. (2a Edición). Mexico: McGraw-Hill.
- Uncu, O.N., & Cekmecelioglu, D. (2011). Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Management*, 31(4), 636-643.
- Urtasun, N., Hirsch, D.B., Baieli, M.F, Miranda, M., Cascone, O., & Wolman, F. (2018). Valorización del suero de queso. Un desafío para la cromatografía a escala industrial. *Revista Farmacéutica*, 160(1), 47-61.
- Van Dael, P., P. Kastenmayer, J., Clough, A.R., Jarret, D.V., Barclay, D.V., & Maire, J.C. (2005). Substitution of casein by β -casein or of whey protein isolate by α -lactalbumin does not affect mineral balance in growing rats. *The Journal of Nutrition*, 135(6), 1438-1443.
- Veisseyre, R. (1980). *Lactología Técnica* (2a Edición). Caracteres, Composición y Estructura de la Leche. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Vidgren, V., & Lomdesborough, J. (2012). Characterization of the *Saccharomyces bayanus*-type AGT1 transporter of lager yeast. *Journal Institute Brewing & Distilling*, 118(2), 148-151.
- Vienne, P., & Von Stockar, U. (1985). An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, 7(7), 521-526.
- Vincenzi, A., Jachetti, M., Burlani, E. L., Oliveira, E. C., Volpato, G., Neutzling, L., & Volken de Souza, C. F. (2014). Ethanol Bio-Production from Ricotta Cheese Whey by several Strains of the Yeast *Kluyveromyces*. *American Journal of Food Technology*, 9(6), 281-291.
- Vital, P., & Larralde, C.P. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia de la Universidad de Aguas Calientes*, 24(67), 86-91.
- Volkin, D.B., & Klivanov, A.M. (1989). Minimizing protein inactivation. In: Creighton T.E, editor. *Protein function: a practical approach* (pp 1-24). Oxford: Oxford University Press.
- Wadskog, I., & Adler, L. (2003). Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In Hohmann, S. and Mager W.H (Eds.), *Yeast Stress Responses* (pp 201-240), Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Walia, N.K., Sekhon, K.K., Chaudhary, D.P., Cameotra, S.S., & Srivastava, P. (2014). Optimization of fermentation parameters for bioconversion of corn to ethanol using response surface methodology. *Journal of Petroleum Environmental Biotechnology*, 5(3), 1-8.

- Walker, G.M. (2014). Microbiology of wine-making. In: C Batt, & M.L. Tortorello (Eds), Encyclopedia of Food Microbiology (pp. 787-792). Boston: Elsevier Science Publishers.
- Walker, G.M., & Stewart, G.C. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(30), 1-12.
- Wang, M., Wang, J., Tan, J.X., & Mou, J.F. (2011). Optimization of ethanol fermentation from sweet sorghum juice using response surface methodology. *Energy Sources*, 33(12), 1139-1146.
- Walzem, R.L., Dillard, C.J., & German, J.B. (2002). Whey composition millenina of evolution create functionalities for mammalian nutrition what we know we may be overlooking. *Food Science and Nutrition*, 42(4), 353-375.
- Whang, Z., Yan, M., Chen, X., Li, D., Qin, L., Li, Z., Yao, J., & Liang, X. (2013). Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 41-45.
- Wimalasena, T.T., Greetham, D., Marvin, M.E., Liti, G., Chandelia, Y., Hart, A., Phister, T.G., Tucker, G.A., Smart, K.A. (2014). Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp. yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. *Microbial Cell Factories*, 13(37), 1-13.
- Winkelhausen, E., Velickova, E., Amartei, S.A., & Kuzmanova, S. (2010). Ethanol production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in lyophilized cellulose gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 2214-2220.
- Yang, S.T., & Bednarcik, J. (2001). Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by Immobilized β -Galactosidase. In B. D. Saha (Eds), *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals* (pp 131-153). Washington D.C: American Chemical Society.
- Zabed, H., Faruq, G., & Sahu, J.N. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*, 1, 1-11. Article ID 957102.
- Zadow, J. G. (1994). Utilization of milk components: Whey. In R. K. Robinson (Ed.), *Modern dairy technology, advances in milk processing*, Vol. 1 (2nd ed.) (pp. 313–373). London: Chapman & Hall.
- Zadow, J. (2003). Protein concentrates and fractions. In: Francis, F. (Eds.). *Encyclopedia of Food Science and Technology* (pp 6152-6156). New York: Wiley.
- Zafar, S., Owais, M., Salleemuddin, M., & Husain, S. (2005). Batch kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(6), 597-604.
- Zafar, S., & Owais, M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 295-298.
- Zhao, J., & Xia, L. (2010). Ethanol production from corn stover hemicellulosic using immobilized recombinant yeast cells. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 28-32.
- Zi, L.H., Liu, C.G., Xin, C.B., & Bai, F.W. (2013). Stillage back set and its impact on ethanol fermentation by the flocculating yeast. *Process Biochemistry*, 48, 753-758.

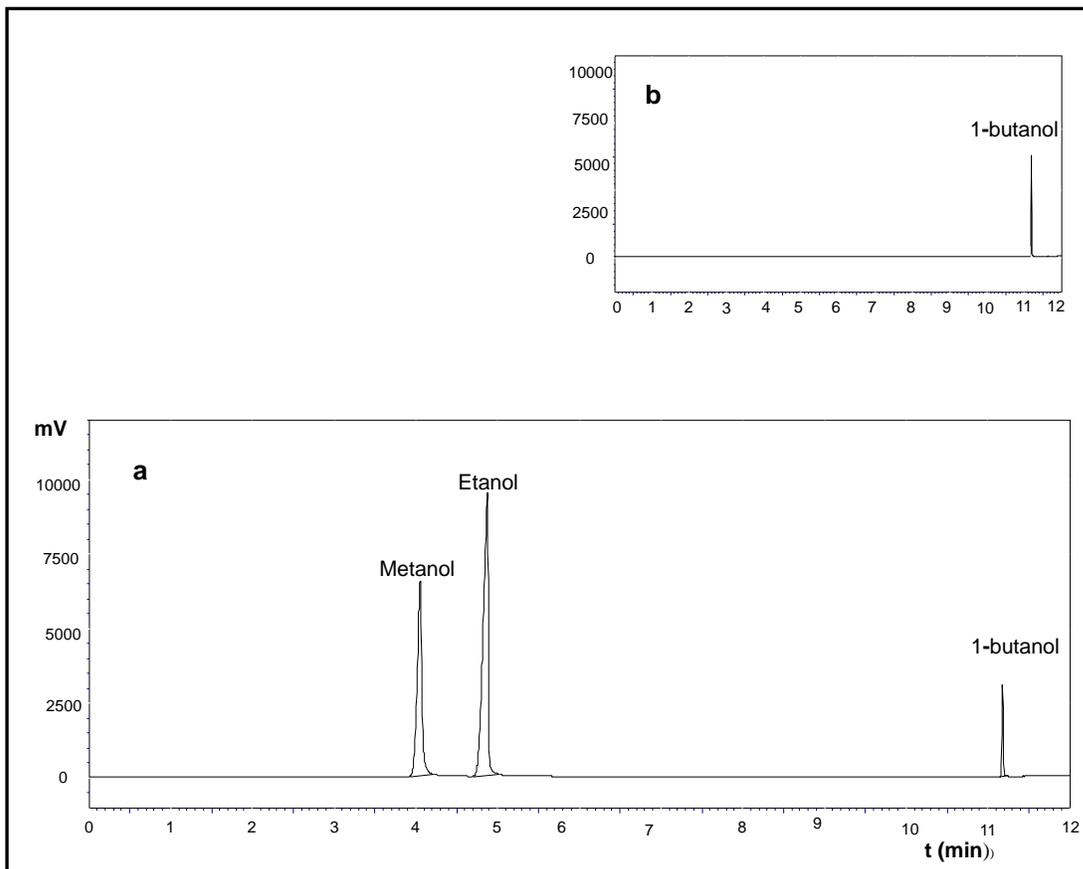
Znamirowska, A., Rożek, P., Buniowska, M., & Kalicka, D. (2017). Dynamics of fermenting low-lactose whey by *Saccharomyces bayanus* (bayanus G995) and quality of whey beverages. *Food. Science. Technology. Quality*, 24, 3(112), 109-120.

Anexos

Anexo 1

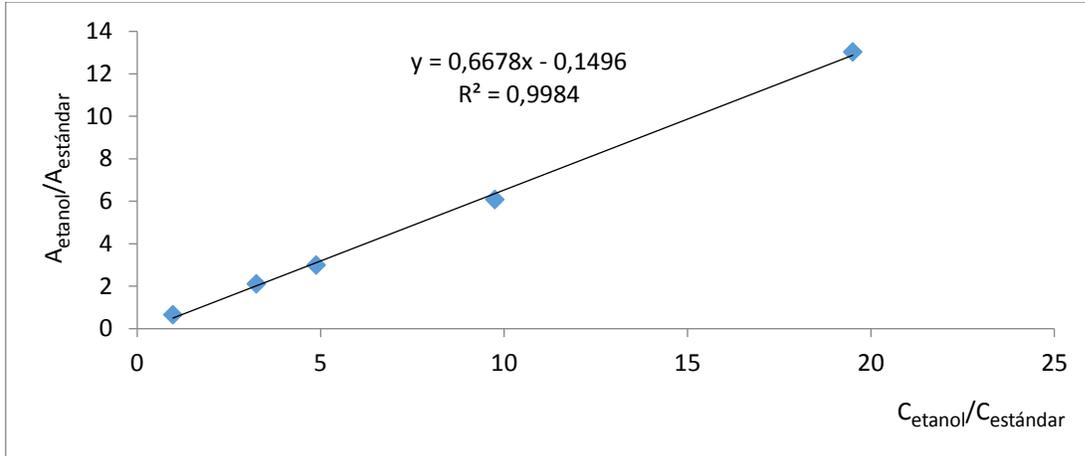
Cromatogramas de alcoholes:

- a) Elución de metanol, etanol y 1-butanol (estándar interno)
- b) Solución de 1-butanol (estándar interno)



Anexo 2

Curva de calibración del etanol y el estándar interno (1-butanol)



Curva de calibración del metanol y el estándar interno (1-butanol)

