

**Fermentación de lactosuero para la obtención de
etanol y su uso en cervezas y bebidas saborizadas
Revisión de Literatura**

Mateo Sebastián Aráuz Solís

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Fermentación de lactosuero para la obtención de etanol y su uso en cervezas y bebidas saborizadas

Revisión de Literatura

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Mateo Sebastián Aráuz Solís

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Revisión de literatura sobre fermentación de lactosuero para la obtención de etanol y su uso en cervezas y bebidas saborizadas.

Mateo Sebastián Aráuz Solís

Resumen. El lactosuero es un subproducto que se obtiene de la producción de quesos frescos o de la fermentación de yogur concentrado. El lactosuero tiene gran potencial para brindar un valor agregado a productos terminados, y se puede usar como un producto adjunto en la preparación de bebidas alcohólicas. El objetivo de la presente revisión literaria fue evaluar el uso del lactosuero para la obtención de etanol y su aplicación en cervezas y bebidas saborizadas y a su vez determinar el rendimiento que tiene el lactosuero en la fermentación alcohólica para bebidas tipo cerveza. Asimismo, se destaca el proceso de fermentación, conceptos de suero ácido, dulce y salado, el uso de ingredientes incluyendo enzimas, tipos de microorganismos, y los requerimientos de fermentación para la producción de etanol. Igualmente, se discute sobre algunos aspectos que se deben controlar durante la producción de cervezas a partir de lactosuero. Para ello, se debe considerar que durante la fermentación del lactosuero con *Saccharomyces cereviceae*, los volúmenes de etanol obtenidos por volumen de lactosuero fermentado son reducidos. Esto último indica que el rendimiento del proceso de fermentación de lactosuero para la producción de etanol es bajo, sin embargo, utilizando determinadas levaduras capaces de hidrolizar la lactosa se puede obtener porcentajes de etanol más altos. Por otro lado, se pueden emplear enzimas como la lactasa, las cuales hidrolizarían la lactosa en azúcares simples, proporcionando mayor cantidad de azúcares fermentables al proceso de fermentación.

Palabras clave: Azúcares fermentables, lactasa, levaduras, suero ácido, suero dulce.

Abstract. Whey is a by-product obtained from the production of fresh cheeses or from the fermentation of concentrated yogurt. Whey has great potential to provide added value to the final products and can be used as an adjunct in the preparation of alcoholic beverages. The objective of this literature review was to evaluate the use of whey to obtain ethanol and its application in beers and flavored beverages, as well as to determine the performance of whey in alcoholic fermentation for beer-type beverages. In addition, the fermentation process, concepts of sour, sweet and salty whey are discussed, as well as the use of ingredients including enzymes, types of microorganisms, fermentation requirements for ethanol production are highlighted. Likewise, some aspects that must be controlled during the production of beers from whey are discussed. For this, it should be considered that during the fermentation of whey with *Saccharomyces cereviceae*, the volume of ethanol obtained per volume of fermented whey are low. The latter indicates that the performance of whey fermentation process for ethanol production is low, however, using certain yeasts capable of hydrolyzing lactose, higher percentages of ethanol can be obtained. On the other hand, enzymes such as lactase can be used, which would hydrolyze lactose into simple sugars, providing a greater amount of fermentable sugars to the fermentation process.

Key words: Acid whey, fermentable sugars, lactase, sweet whey, yeasts.

ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Índice General.....	iii
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
4. CONCLUSIONES.....	24
5. RECOMENDACIONES.....	25
6. LITERATURA CITADA	26

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Composición del lactosuero dulce y ácido.....	7
2. Ejemplos de metabolitos primarios y secundarios producidos por ciertas levaduras.	15
3. Análisis de varianza de los factores que influyen en la producción de etanol a partir de lactosuero.	21
4. Cálculo del porcentaje de rendimiento para la obtención de etanol.....	22

Figuras	Página
1. Obtención de etanol a partir de glucosa.	4
2. Proceso para la obtención de suero pre-tratado.....	11
3. Proceso de elaboración de cerveza.....	18
4. Diagrama de Pareto de los efectos principales a un nivel de confianza del 95%.....	20
5. Concentración en porcentaje de etanol.....	22

1. INTRODUCCIÓN

Los sueros lácteos están definidos como una fracción de la leche proveniente de cualquier especie que no se precipita por acciones del cuajo o por ácidos que se da en el proceso de elaboración de quesos. El suero contiene compuestos hidrosolubles y constituye el 90% de la leche, en esta solución se encuentra proteínas solubles, lactosa, vitaminas y minerales, por ello el suero es una de las mayores fuentes de proteínas alimentarias que aún se encuentra fuera de los canales del consumo humano (Terán *et al.* 2011).

El lactosuero es un subproducto de la elaboración del queso, el cual se caracteriza por el color amarillo-verdoso, la forma opalescente, y el alto valor nutritivo debido a la presencia de proteínas de alto valor biológico (Kamei *et al.* 1975). En la actualidad se sigue desperdiciando en países en vías de desarrollo en lugar de direccionarlo para diferentes usos como: alimentación animal o como sustrato microbiano. Por otro lado, el suero de leche contiene cantidades significativas de proteína, grasa, azúcar (lactosa), vitaminas y algunas trazas de otros elementos.

El lactosuero tiene gran influencia sobre la actividad antitrombótica, ya que estimula la proliferación y las funciones biológicas de las bifidobacterias que se encuentran en el tracto intestinal de los niños alimentados con leche materna (Socorro y Verdalet 2013).

La producción de etanol se puede realizar a través de rutas químicas (hidratación catalítica del etileno) y por la ruta biotecnológica (fermentación). Mediante la fermentación se utiliza a microorganismos capaces de producir etanol por medio de sustratos disponibles, tales como lactosa, xilosa y almidón. A través de procesos biotecnológicos se busca la producción de etanol por medio del suero de leche, el cual es generado como residuo de la preparación de un producto lácteo (Trevan 1990).

La obtención de etanol a partir de lactosuero es considerada un recurso energético sostenible, con alta viabilidad técnica, que brinda ventajas medioambientales y económicas a largo plazo, obtenido de la fermentación realizada por los microorganismos los cuales metabolizan los azúcares provenientes de subproductos de grandes procesos industriales (Jáquez *et al.* 2015). Es de suma importancia recalcar el valor que tiene el lactosuero, ya que como sustrato fermentable generaría una oportunidad de desarrollo para nuevas formas de producción y cuidado con el medio ambiente. Existen dos especies de levaduras unicelulares (*Saccharomyces cerevisiae* y *S. bayanus*), que abarcan un gran grupo de cepas salvajes y domesticadas. Estas levaduras son empleadas tradicionalmente en la producción del alcohol en bebidas fermentadas en todo el mundo (McGovern 2009).

Las levaduras tienen la capacidad de usar una gran variedad de compuestos carbonatados que se encuentran presentes en medios con azúcares simples, de igual forma estos microorganismos cuentan con la capacidad de desdoblar azúcares compuestos (Leveau y Bouix 2000). Existen microorganismos capaces de fermentar lactosa tales como: *Kluyveromyces marxianus*, antes conocida como *Kluyveromyces fragilis*, además de *Kluyveromyces lactis* y *Candida kefyr* (Garibay *et al.* 1993).

La literatura nos brinda un sinnúmero de ejemplos para la realización de una bebida alcohólica tipo cerveza usando varios ingredientes en su formulación, tornando diversos sabores y texturas (García 2015). Diferentes investigaciones resaltan el uso de amaranto molido para elaborar cerveza artesanal (Ramírez *et al.* 2013), elaboración de cerveza a partir de quínoa (Valenzuela 2007), asimismo, en Ecuador se implementó el uso de tubérculos para elaborar cerveza como almidón de yuca y malta (Carvajal 2011).

Se han realizado estudios para la obtención de etanol a partir de lactosuero, donde se ha observado que el rendimiento de fermentación para la obtención de etanol con lactosuero es bajo. Empleando concentraciones de lactosa de 20 a 25%, se obtiene caldos de 10 a 12% de etanol si se usan condiciones de cultivo y cepas idóneas. No obstante, la conversión de lactosa disminuye de 90% en suero normal a 70 - 80% debido a la cantidad de suero que se procesa (Garibay *et al.* 1993).

La realización de bebidas saborizadas a partir de lactosuero como ingrediente adjunto es una posibilidad de aprovechamiento de sustrato. Asimismo, el uso de diferentes ingredientes que ayuden a convertir el lactosuero en azúcares simples, como enzimas o levaduras con las características ideales para llevar a cabo el proceso de fermentación, es una alternativa que se debe desarrollar para el uso y aprovechamiento del lactosuero.

Este trabajo de revisión bibliográfica trata sobre la fermentación de lactosuero para la obtención de etanol y su uso en cervezas y bebidas saborizadas, estableciendo los siguientes objetivos:

- Recopilar y sintetizar información sobre la fermentación de lactosuero y las diferentes condiciones que se requiere para su uso en cerveza y bebidas saborizadas.
- Explicar los detalles sobre los pretratamientos que se le realizan al lactosuero previo a su uso en los procesos de fermentación alcohólica.
- Describir cada uno de los pasos del proceso de fermentación para producción de bebidas fermentadas con lactosuero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de búsqueda

De acuerdo con el propósito de esta revisión de literatura, se seleccionaron artículos relacionados con la fermentación de lactosuero para la producción de etanol y bebidas saborizadas. Se utilizaron bases de datos confiables y conocidas para buscar información. Estos principalmente fueron: Springer, “Science-Direct”, SciELO, “Nature” y Biblioteca Digital Wilson Popenoe; todo ello para obtener información fiel a la realidad y proporcionar una base científica para la redacción de una reseña de literatura científicamente valiosa.

Criterios de selección de artículos

Para determinar qué artículos eran adecuados para su inclusión en esta revisión de literatura, se consideraron factores como el año de publicación, la base de datos fuente, la relación con el tema y la base científica. En cuanto al año de publicación, para obtener la información más actual, se decidió utilizar principalmente artículos con menos de 10 años. En cuanto a las bases de datos fuente de los artículos, se eligieron porque tienen una reputación fundamental en la comunidad y tienen credibilidad científica para escribir artículos con valor científico. Finalmente, considerando que el artículo está directamente relacionado con el tema de la fermentación del suero de leche para la obtención de etanol y bebidas saborizadas.

Diseño de investigación

Se incluyeron dos diseños para presentar de mejor manera los resultados en los estudios mencionados por Jácquez *et al.* (2015) y López y Prado (2015).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uso de la lactosa para la fermentación

Según algunos autores para la elaboración de etanol, la etapa de fermentación dura alrededor de una semana a una temperatura de 20 °C (Stanier *et al.* 1996; Vincent *et al.* 2006). Cuando ocurre este proceso, las levaduras empiezan su proceso de reproducción y el material fermentable se transforma en un líquido con cierto contenido de alcohol etílico. Para el correcto desarrollo de este proceso, es necesaria una apropiada concentración de oxígeno, fuente de nitrógeno, entre otros nutrientes. Cuando es consumido, el oxígeno empieza la fase anaeróbica en la cual la glucosa se transforma en etanol y CO₂ (Pares y Juárez 1997; Hernández 2003).

Según Varnan y Sutherland (1997), un aspecto fundamental son las levaduras, ya que son los microorganismos responsables de la transformación de los azúcares fermentables, como lo es *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura frecuentemente usada en la industria cervecera. Según Vásquez y Dacosta (2007), la formación de etanol consta de dos etapas como se muestra en la Figura 1:

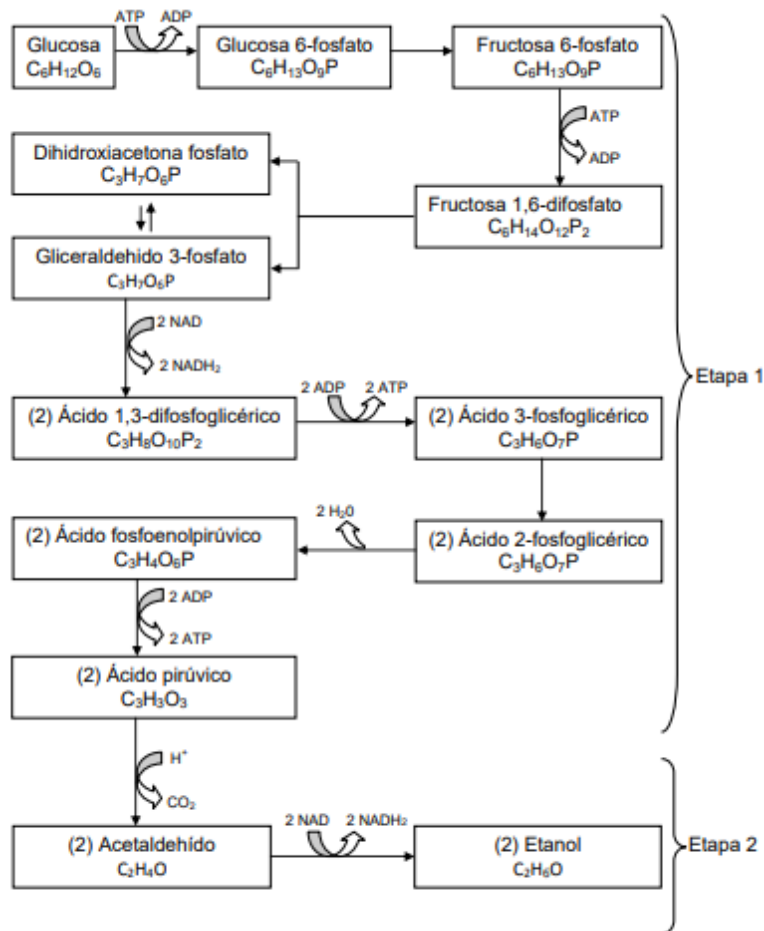


Figura 1. Obtención de etanol a partir de glucosa.

La secuencia para la degradación de una molécula de glucosa para llegar a dos de etanol y dos de dióxido de carbono es un proceso que involucra dos etapas: 1) Formación en anaerobiosis de dos moléculas de piruvato a través de una ruta metabólica (glucólisis); 2) Descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para dar lugar a dos moléculas de acetaldehído, las cuales se simplifican en etanol como se denota en la Figura 1 (Varnan y Sutherland 1997; Hernández 2003).

El uso de la lactosa para la producción de etanol es una alternativa de gran interés para darle uso a un subproducto de la industria láctea (Dragone *et al.* 2009). Para la fermentación del lactosuero, así como la fermentación de la glucosa, es necesario el uso de levaduras que completen el proceso. Para la producción de etanol a partir de lactosuero como sustrato, se pueden emplear microorganismos como *Kluyveromyces marxianus var. Marxianus* o *Kluyveromyces fragilis*. Es importante destacar que el proceso se debe realizar bajo condiciones asépticas de suero pasteurizado, con una temperatura de fermentación entre 24 a 34 °C (Mawson 2003; Dragone *et al.* 2009).

La lactosa del suero puede ser fermentada directamente por determinados microorganismos para evitar su existencia en las aguas residuales. Por tanto, puede utilizarse como una excelente materia prima para la fermentación alcohólica, especialmente en el proceso de alta productividad. De esta forma, es una buena opción para realizar procesos biotecnológicos (Gough *et al.* 1996).

Actualmente, en una cierta concentración de etanol, la productividad de la fermentación clásica es baja y los subproductos inhiben el crecimiento celular (Padín y Díaz 2006), lo cual conduce a una fermentación a largo plazo y altos costos de producción. Para reducir el costo energético de la recuperación, es necesario desarrollar procesos que utilicen tecnologías no convencionales (como el uso de tecnología de ingeniería de separación) para aumentar la productividad, de manera que se elimine la inhibición de metabolitos en la levadura y se incremente la productividad del proceso de fermentación y producir etanol que cumpla con los estándares de calidad (Sánchez y Cardona 2005).

La levadura *Kluyveromyces fragilis*, fermenta galactosa, sacarosa, rafinosa y lactosa, y asimila β -glucósidos, crece a la temperatura de 20-30 °C y a valores de pH óptimos entre 4.5 y 5.0. La presencia o ausencia de oxígeno en el medio determinará la oxidación completa (utilización aeróbica del sustrato) o la fermentación del alcohol (utilización aeróbica) a partir de este hecho se puede concluir que, en un sistema de producción de etanol discontinuo, el inicio aeróbico es obtener la máxima biomasa, ya que, si las condiciones anaeróbicas comienzan demasiado temprano, la densidad de población del microorganismo no será suficiente para lograr una buena tasa de conversión (Crueger y Crueger 1993).

Tipos de lactosuero

Suero salado. Cuando la sal se dispersa en la cuajada molida durante el proceso de secado, se disuelve en la humedad de la superficie y luego se difunde en la cuajada. Por lo tanto, la cuajada formará un efecto de deshidratación en las partículas de cuajada, expulsando así el suero y el agua durante el proceso de prensado, y el flujo de suero producido en este proceso se llama "suero salado" (Sutherland 1974).

El suero salado rara vez se usa en la industria láctea debido a su alto contenido de sal y altos costos de manipulación y procesamiento. Este suero representa del 2 al 5% del suero total producido durante la producción del principal queso cheddar y otros quesos secos en sal (Blaschek *et al.* 2007).

Se pueden utilizar herramientas para pretratar el suero salado antes de la fermentación y destilación, tradicionalmente, los clarificadores de suero se utilizan para eliminar las partículas finas de caseína, y los separadores de suero se utilizan para eliminar la crema del suero, esto deja sustratos no fermentables como proteína de suero, minerales y ácidos, que no son útiles para la producción de bebidas destiladas. Por lo tanto, antes de la fermentación, serán beneficiosos ciertos métodos de eliminación de proteínas como la ultrafiltración que puede eliminar otros compuestos potencialmente interferentes, como minerales y ácidos. La nanofiltración tiene la ventaja adicional de la lactosa concentrada, que puede aumentar la concentración de sustratos fermentables en el suero (Schmoldt *et al.* 1975).

El principal azúcar fermentable del suero es lactosa, y *Saccharomyces cerevisiae* no se suele utilizar como la levadura productora de etanol. *Kluyveromyces marxianus*, es una levadura fermentadora de lactosa que se utiliza para convertir la lactosa en etanol. El nivel de lactosa en el suero crudo solo permite la producción de "cerveza" o "licor de lavado" con una concentración de etanol de 2 a 3% v/v (Schmoldt *et al.* 1975).

Suero ácido. El suero ácido es un subproducto obtenido de la filtración del yogur y la eliminación para la industria representa un desafío. El suero ácido contiene elementos valiosos que pueden usarse para la creación de productos con valor agregado. Uno muy importante sería la fermentación de la lactosa en el suero para una bebida alcohólica, un ejemplo claro sería la cerveza agria, ya que el aporte ácido del suero le brinda ese sabor al producto (Lawton y Alcaine 2019).

Según la literatura, el suero ácido contiene una cantidad aproximada de 6.4 g de ácido láctico por litro, por lo que tiene un pH menor y una solubilidad mayor. Además, presenta un contenido de minerales tales como: calcio, magnesio y fosfato, en comparación con el suero dulce (Bansal y Bhandari 2016; Smith *et al.* 2016).

La utilización de suero ácido en la producción de bebidas alcohólicas, tales como la cerveza, es una vía de valor agregado importante. Las cervezas agrias son producidas con bacterias ácido-lácticas, las cuales se añaden durante el proceso de maceración causando una disminución del pH antes de la fermentación del mosto, es decir que el lactosuero le añade un mejor uso a la producción de bebidas alcohólicas (Osburn *et al.* 2018). El suero puede reemplazar la totalidad del agua usada en el proceso de macerado, ya que proporciona la base agria. Se conoce que algunos cerveceros utilizan yogur griego como fuente de cultivos bacterianos de ácido láctico, los cuales contienen *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, por tanto, usar yogur colado ayudaría en este proceso (Burke *et al.* 2015).

Suero dulce. El suero dulce se puede obtener como subproducto a partir de la elaboración de quesos con el uso de renina, enzima que precipita la caseína para la elaboración del queso. El suero dulce se lo puede convertir en ácido mediante la fermentación de la lactosa presente en el mismo (Jeličić *et al.* 2008).

También se puede encontrar el suero de mantequilla el cual también es denominado suero dulce. Sin embargo, la cantidad de este subproducto no es representativa por lo cual el suero ácido es más preciso y aporta mejores beneficios a las bebidas saborizadas tales como: cervezas, vinos, entre otros (Puente 2018).

En un estudio realizado por Vicenzi *et al.* (2014) se evaluó la productividad de etanol mediante el aislamiento de varias cepas de levadura *Kluyveromyces* del suero dulce, la cepa más adecuada para convertir lactosa del suero en etanol. En dicho estudio, llegaron al máximo con altos resultados de las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis*, el coeficiente de rendimiento de la producción de etanol en la calidad de las células y la eficiencia de producción de etanol.

Christensen *et al.* (2011) evaluaron la producción de etanol utilizando *Kluyveromyces marxianus* en suero dulce por fermentación continua por lotes, el cual demostró que este microorganismo puede utilizar eficientemente la lactosa para producir etanol y la fermentación por lotes para lograr un alto rendimiento de etanol (0.50 g de etanol/g de lactosa), especialmente cuando se utilizan valores de pH de 4 - 5 y temperaturas entre 30 y 40 °C. En el Cuadro 1 se puede observar la composición detallada de los nutrientes que tiene el lactosuero dulce y ácido.

Cuadro 1. Composición del lactosuero dulce y ácido.

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63.0- 70.0	63.0- 70.0
Lactosa	46.0- 52.0	44.0- 46.0
Proteína	6.0- 10.0	6.0- 8.0
Calcio	0.4- 0.6	1.2- 1.6
Fosfatos	1.0- 3.0	2.0- 4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1

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

Tanto en el lactosuero ácido como el dulce, se estima que por cada kg de queso que se realiza se obtiene 9 kg de lactosuero, por tanto, alrededor del 85 - 90% de volumen de leche. Además, este subproducto contiene el 55% de los nutrientes de la leche (Liu *et al.* 2005). Uno de los nutrientes más abundantes es la lactosa seguido de proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Muñi *et al.* 2005; Panesar *et al.* 2007).

Contaminación ambiental producida por lactosuero y oportunidades de uso

El lactosuero es una fuente importante de contaminación ambiental por su alto contenido de materia orgánica, lo cual se expresa como DBO (demanda biológica de oxígeno) y DQO (demanda química de oxígeno). Este subproducto puede suponer una contaminación entre 30,000 y 50,000 mg/L expresados en DBO y entre 60,000 y 80,000 mg/L expresados como DQO (Ávila *et al.* 2000). Alrededor del 90% de esta carga es aportada por el contenido de lactosa, un disacárido contiene un enlace β -glucosídico entre sus azúcares simples que muchos microorganismos no son capaces de degradar (Berruga *et al.* 1997). El vertimiento del lactosuero en fuentes hídricas ocasiona que el

agua se quede sin oxígeno, por causa de la acción microbiana que transforma la materia orgánica en compuestos que reducen el pH del agua causando como consecuencia la producción de malos olores y muerte de organismos acuáticos (Londoño *et al.* 2008).

Existen diferentes tipos y niveles de tratamiento para reducir la carga de contaminantes del vertido de lactosuero o también denominado aguas residuales y convertirlo en inocuo para el medio ambiente. Estos tratamientos se pueden clasificar como: físicos, químicos y biológicos (Aymerich 2000).

Tratamiento físico. Se refiere a todos aquellos tratamientos que emplean las fuerzas físicas para tratar de reducir los niveles de contaminación. Por lo general, se usan en todos los niveles, sin embargo, algunas operaciones son exclusivas de la fase de pretratamiento tales como:

- Tamizado
- Mezclado
- Sedimentación
- Evaporación

Tratamiento químico. Todos aquellos procesos que involucra la eliminación de contaminantes precedentes en el agua residual y que se lleva a cabo mediante la adición de reactivos químicos, algunas operaciones que se pueden mencionar son:

- Coagulación-floculación
- Precipitación química
- Oxidación-reducción
- Osmosis inversa

Tratamiento biológico. Este tratamiento es facilitado por bacterias que digieren la materia orgánica presente en los fluidos residuales, estos líquidos residuales contienen sustancias que se utilizan como nutrientes para dichos microorganismos, algunas de las operaciones biológicas son:

- Lodos activados
- Filtros bacterianos
- Biodiscos

En un estudio realizado por Aymerich (2000), describió un ejemplo de tratamiento para una pequeña quesera en donde resaltó aspectos como:

- El uso de cajas de rejilla para partículas sólidas como pedazos de queso, pelos, papeles, etc.
- Trampas de grasas dado que con el uso de leche las partículas de grasa son muy pequeñas, y es adecuado que la partícula mínima sea de 20 micras dado que en la leche este es el tamaño máximo.
- Digestor anaeróbico, ya que logra remover al menos 55% de la carga contaminante referente a DBO utilizando una etapa ácido-génica. Este digestor consta de tres cámaras entrando por la parte superior logrando una mayor digestión y sedimentación de lodos logrando que natas y partículas de grasa pasen por los filtros, la entrada es de 12,100 ppm de DBO con una salida del digestor de 5,500 ppm.

En cuanto a la disposición final del residuo del lactosuero, en caso de no encontrar acceso a un cuerpo de agua cercano a la planta de quesos, se hará uso de drenajes tomando en cuenta la filtración construyendo dos líneas independientes del drenaje para usarlos de manera alterna durante todo el año (Aymerich 2000).

Producción de etanol

Se debe contar con diversos factores para la correcta producción de etanol. Una temperatura adecuada para la formación de etanol se encuentra entre los 32 a 35 °C, con un pH entre 4 a 5, para la mejor formación y trabajo de la levadura (Navarro *et al.* 1986).

El lactosuero presenta resultados óptimos en la producción de etanol, este proceso fermentativo obtiene un rendimiento de etanol en un rango entre 75 a 85% del valor teórico, es decir que por cada 0.538 kg de etanol se necesita de 1 kg de lactosa metabolizada, esto nos indica la importancia de la producción de etanol a base de lactosuero (Parra 2009).

En un estudio realizado por Owais y Zafar (2006), se estableció que para la producción de etanol es mejor utilizar la levadura *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1288, ya que esta desarrolla una curva cinética en la producción de etanol y biomasa, utilizando como sustrato el suero crudo. Esto indica que existen levaduras que son más efectivas para metabolizar el lactosuero, como la mencionada anteriormente en comparación con *Saccharomyces. cerevisiae* la cual es más efectiva cuando se utiliza para fermentar otras materias primas como la cebada. El uso de *Kluyveromyces marxianus* permite poder metabolizar 2.1 gramos de etanol por cada litro de suero crudo y 8.8 gramos de biomasa por cada litro de suero crudo en 22 horas de fermentación.

Pocas levaduras pueden absorber lactosa para producir etanol. *Kluyveromyces marxianus* es un microorganismo ampliamente utilizado que convierte la lactosa en etanol en la industria. Otros microorganismos utilizados en la producción industrial de alimentos y bebidas se han probado a escala experimental para determinar si son adecuados para convertir lactosa en bioetanol. Estos organismos incluyen *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* (Hughes *et al.* 2018).

La nanofiltración tiene la ventaja adicional de concentrar lactosa para aumentar la concentración de sustratos fermentables en el suero, lo que aumentará sustancialmente la eficiencia de la fermentación y destilación. Es importante señalar que estas unidades son costosas de operar y requieren muchos recursos, por lo que es poco probable que se utilicen para el procesamiento manual de productos lácteos. Sin embargo, las unidades de membrana ya se utilizan en algunas instalaciones de quesos especiales, por lo que puede ser una opción relacionada a la obtención de etanol (Hughes *et al.* 2018).

Condiciones de uso

El lactosuero es un líquido que se obtiene de la precipitación de la caseína. Existen dos tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la manera en que se elimina la caseína. Por defecto existe el suero dulce, en el cual se coagula caseína utilizando la renina a pH de 6.5. El suero ácido se obtiene del proceso de fermentación para coagular la caseína en la elaboración de quesos frescos (Roginski *et al.* 2003).

Para poder utilizar de mejor manera el lactosuero para la formulación de cerveza y bebidas saborizadas, es necesario que la fermentación tenga la eficiencia necesaria para la producción de etanol, por tanto, hidrolizar el lactosuero para cambiar las condiciones requeridas para el proceso.

Las proteínas hidrolizadas son muy utilizadas debido a que los aminoácidos que proporciona el lactosuero hidrolizado son rápida y completamente absorbidos tanto a nivel digestivo como en procesamiento, a diferencia con la proteína intacta sin hidrolizar (Santana *et al.* 2008; Spellman *et al.* 2009). Sin embargo, la lactosa es uno de los disacáridos más difíciles de fermentar, el número de enzimas y microorganismo fermentadores es limitado, además que los microorganismos genéticamente modificados para su bioconversión hacen que el costo del proceso sea alto y no rentable (Ramakrishnan y Hartley 1993).

Las condiciones principales para el uso de lactosuero para su hidrólisis son principalmente la temperatura y el pH, además, cabe recalcar que existen dos medios que facilitan su condición, la hidrólisis ácida y enzimática. El primer método se caracteriza por el uso de medios ácidos concentrados a altas temperaturas de hasta 150 °C, mientras que la hidrólisis enzimática utiliza enzimas en temperatura moderadas y pH específicos. Además, es importante recalcar que no desnaturaliza las proteínas y no produce color marrón en la solución (Santos *et al.* 1998; Hatzinikolaou *et al.* 2005).

Calidad de lactosuero como pretratamiento

La calidad composicional e higiene sanitaria del lactosuero es un factor importante por considerar para su utilización en la elaboración de productos o ingredientes, asimismo, es de importancia la calidad de la leche utilizada como el manejo en la elaboración del queso, ya que determinará las características del suero (Jelen 2003). La composición depende de la estacionalidad de la leche, prácticas de manejo de la vaca y proceso de elaboración de queso (Panesar *et al.* 2007).

Para el uso del lactosuero como materia prima en la elaboración de ingredientes o productos de consumo directo, se necesita que cumpla con parámetros de calidad, este proceso debe ser adecuado con el producto a usar y cumpliendo requerimientos como (Panesar *et al.* 2007):

- pH entre 6.0 - 6.6
- Proteína mínima 0.7 g / 100 g
- Grasa 0.05%
- Partículas de queso o finos de caseína < 0.02%
- Nitrato < 3 ppm
- Nitrito < 1 ppm
- Sin agregado cloruro de sodio
- Ausencia de colorantes

- Antibiótico negativo
- Recuento total < 10000 UFC/mL
- Recuento de termo-resistente < 1000 UFC/mL
- Coliformes < 50 UFC/mL
- *Bacillus cereus* < 1 UFC/mL
- Anaerobios sulfitos reductores < 1 UFC/mL

Como se muestra en la Figura 2, una vez terminado el proceso de elaboración de queso, el lactosuero debe ser filtrado, y posteriormente debe ser pasteurizado a 72 °C durante 15 segundos. El descremado es opcional según el uso final del lactosuero, se debe almacenar en condiciones de inocuidad a temperaturas menores a 6 °C por un periodo máximo de 24 horas (Panesar *et al.* 2007).

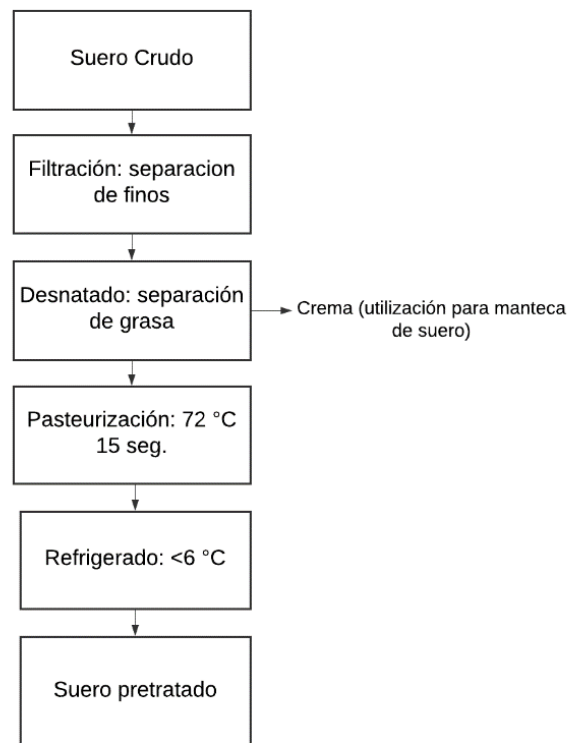


Figura 2. Proceso para la obtención de suero pre-tratado (Panesar *et al.* 2007).

Uso de enzimas para la fermentación alcohólica con lactosuero

La actividad de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria se suele expresar como la cantidad de producto liberado por unidad de tiempo. La medición se puede realizar en condiciones estrictamente definidas en cuanto a temperatura, pH, ionización, concentración y tipo de sustrato (Headon y Walsh 1993). Cuando la enzima reacciona con el sustrato respectivo, la enzima necesita las mejores condiciones para mostrar completamente su actividad y se requiere un contacto continuo y sin interrupciones para expresar la máxima actividad enzimática (Uhlig 1998). Dentro de los factores más importantes a considerar para la fermentación alcohólica destacan, la concentración de enzimas, concentración de sustratos, inhibidores e indicadores, pH, fuerza iónica y temperatura. Es importante destacar el análisis de estos factores en las reacciones enzimáticas (Hatzinikolaou *et al.* 2005).

La enzima α -amilasa es una de las más importantes endoamilasas industriales, ya que es capaz de romper los enlaces glicosídicos (Zhang *et al.* 2017). La α -amilasa es producida por animales, plantas y microorganismos, siendo los microorganismos los más usados para su producción debido a su fácil manejo y potencial económico en la industria, así como elaboración de cerveza, destilación, producción de tortas, jarabes de almidón entre otros (Shahhoseini *et al.* 2003; Roy *et al.* 2013). La enzima β -amilasa o también denominado α -1,4 glucan-maltohidrolasas, es una exoenzima que actúa sobre los enlaces α -1,4 glucosídicos en la cadena del almidón, esta enzima separa unidades de maltosa en sus extremos no reductores por hidrólisis alterna de enlaces glucosídicos (Pedroza 1999).

Uso de lactasa para la fermentación alcohólica del lactosuero

La lactasa, o también denominada β -galactosidasa, es una enzima de gran interés biotecnológico por razones nutricionales e industriales, ya que es de utilidad para el desdoblamiento de la lactosa. La enzima causa la hidrólisis del enlace β -1,4 de la lactosa, y la desdobra en sus azúcares simples, glucosa y galactosa, originando un producto con gran poder edulcorante y con gran aporte a un proceso de fermentación alcohólica (Montesdeoca *et al.* 2018).

La lactasa, además de su uso para la elaboración de bebidas saborizadas y alcohólicas, se usa en panificación dado que aporta una mejora en la calidad de los alimentos elaborados con leche (Mogrovejo *et al.* 2009). El método común para hidrolizar la lactosa en la producción de productos lácteos es agregar lactasa. La adición de esta enzima no requiere equipo de procesamiento adicional y la lactasa está ampliamente disponible. El uso de lactasa para hidrolizar la lactosa permite el uso de microorganismos que no producen β -galactosidasa para la fermentación (Hughes *et al.* 2018).

El uso de lactosa para la fermentación alcohólica usando lactosuero tiene gran ventaja, ya que ayuda a mejorar el rendimiento de etanol en el producto como lo menciona Padín y Díaz (2009), quienes evaluaron el efecto de la adición de diferentes concentraciones de lactasa y la sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica de lactosuero. Se encontró que a mayor concentración de lactasa fue más eficiente en la fermentación, ya que se obtuvo un mayor rendimiento y concentración de alcohol (Padín y Díaz 2009).

Tipos de microorganismos

Un papel importante como uso de ingrediente para la producción de etanol a partir de lactosuero son las levaduras, ya que cumplen una función importante en la producción del mismo y otorga propiedades y características únicas en las bebidas fermentadas. *Saccharomyces cerevisiae* es denominado un hongo levaduriforme que puede tener células alargadas, globosas o elipsoidales. Se las puede encontrar agrupadas de dos, en cadenas pequeñas, racimos o solas. La apariencia de las colonias es muy diversa: de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas y brillantes u opacas (López *et al.* 2002).

Saccharomyces cerevisiae se usa comúnmente para la producción de cervezas tipo “Ale” y *Saccharomyces carlsbergensis* se utiliza para cervezas tipo “Lager”. Este tipo de levadura se encarga de fermentar los azúcares que se encuentran en el mosto tal como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa, todos estos sacáridos en ausencia de oxígeno llegan a producir como producto principal etanol y CO₂, productos a los cuales se desea llegar (Varnan y Sutherland 1997).

Para la fermentación de lactosa, es importante destacar el uso de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces sp.*, (*lactis* o *fragilis*), ya que son fuentes seguras de utilización para la hidrólisis de este sacárido, debido a que son preparaciones comerciales que contienen la lactasa de origen fúngico y es importante en uso de operación en pH ácido (2.5 - 4.5), las cuales son apropiadas para suero ácido (Harju *et al.* 2012).

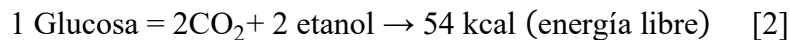
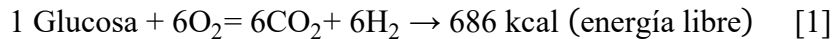
Kluyveromyces fragilis, esta levadura pertenece a la división *Ascomycotina*, tienen una reproducción por gemación multilateral en la cual liberan sus esporas en la madurez, estas levaduras incluyen los géneros *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, las cuales son levaduras abundantes en productos lácteos. Esta especie de levadura produce β - galactosidasa, las cuales ayudan a la fermentación de la lactosa. Además, la *K. marxianus* tiene la coenzima Q-6, la cual interviene en la fermentación del kumis (bebida láctea), así mismo, utilizada para obtener levaduras a partir de lactosuero (Jay 2009).

Torulaspora delbrueckii son levaduras osmotolerantes que son generalmente utilizada para la elaboración de panes tradicionales, pero es encontrada frecuentemente en bebidas alcohólicas, alimentos con alto contenido de azúcar y zumos de frutas. Esta especie es resistente al frío, es decir, puede adaptarse a temperaturas de congelamiento y es generalmente empleada en países como Japón para la fermentación de cepas aisladas del suelo, grano o masas panaderas (Almeida y Pais 1996; Esteve *et al.* 2001).

Zymomonas mobilis ha incrementado su interés, ya que es una alternativa muy viable para la producción de etanol (Rogers *et al.* 1982). *Zymomonas mobilis* es una bacteria anaerobia facultativa, gram negativa, además cuando es cultivada en un medio rico en azúcares, promueve la conversión de los disacáridos en glucosa y fructosa. Asimismo, es capaz de producir otros metabolitos en grandes concentraciones bajo condiciones apropiadas para el cultivo como: sorbitol o glucanato (Bekers *et al.* 2002). *Zymomonas mobilis* es utilizado para producir pulque y vinos de palma alcohólicos. Este microorganismo tiene altas tasas de absorción de azúcares para la producción de etanol, es decir que tiene rendimientos muy parecidos a los teóricos con una formación baja de biomasa (Seo *et al.* 2005).

Requerimientos para fermentación

Por lo general la mayoría de los microorganismos como las levaduras son aerobios facultativos, lo que indica que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno. Por tanto, si cuentan con oxígeno, las levaduras realizan respiración aeróbica para metabolizar los azúcares disponibles incluso el CO₂ y agua, siendo un crecimiento que se aplica a procesos fermentativos para la obtención de proteínas unicelulares (Ecuación 1). La fermentación anaeróbica (Ecuación 2) es la base de la industria cervecera y vinícola, ya que, si las levaduras carecen de oxígeno, fermentan los azúcares produciendo etanol y dióxido de carbono (Tortora *et al.* 1993).



Las levaduras y bacterias necesitan de un fermentador como herramienta principal para la producción de biomasa, estos factores brindan un ambiente propicio para la fermentación. Además de otras condiciones necesarias como: agitación, regulación de temperatura, suministro de oxígeno, adición de nutrientes, control del pH, entre otros (Muñoz y Catrilaf 2013).

Condiciones que controlar durante la fermentación de lactosuero

Si bien el lactosuero es útil para la producción de etanol, no se utiliza para la elaboración de cerveza, ya que puede producir notas no deseadas y desagradables. La opción viable es la utilización de lactasas para descomponer la lactosa en sus azúcares simples y que sea de fácil aprovechamiento para la levadura tradicional de la cerveza, *Saccharomyces. cerevisiae* (Mawson 1994; Olery *et al.* 1997).

La degradación de la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso muy complejo que a menudo tiene dificultades en su realización. El rendimiento estequiométrico apropiado para la transformación de la glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa, es decir que el rendimiento teórico se encuentra entre el 90 y 95%, mientras que los rendimientos de la industria varían entre el 87 y 93% del rendimiento teórico. Otro parámetro que se debe controlar es la productividad la cual define la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen (Alcívar *et al.* 2019).

Si bien es cierto que cada parte del proceso se debe controlar de manera adecuada para obtener el producto deseado, existen ciertos parámetros que determinan e influyen directamente la calidad del producto. La temperatura de fermentación al igual que la levadura utilizada, son de gran importancia, por lo cual, durante la producción es normal el uso de refrigeración para el control durante la fermentación. Asimismo, existen modelos de predicción matemático que ayuda a simular la dinámica de fermentación de cerveza, entre ellos se debe incluir componentes como: azúcares, biomasa y etanol, con estos modelos se puede disminuir y/o controlar posibles problemas (Ramirez y Maciejowski 2007).

Por lo general, el aumento en la concentración de nitrógeno asimilable le brinda un incremento a la producción de compuestos como: alcoholes superiores y ésteres (Hashimoto *et al.* 2012). Algunos tipos de aminoácidos que forman parte del nitrógeno asimilable ocasiona diferentes

respuestas en las levaduras y también en la formación de alcoholes superiores (Yoshimoto *et al.* 2002). Algunas condiciones para la producción de etanol a partir de la fermentación del suero se deben considerar, por ejemplo, realizar un fraccionamiento total o parcial para extraer y / o concentrar los componentes utilizados como sustrato, este fraccionamiento convierte el suero en una materia prima útil y obtiene un suero desproteínizado, desalado, y con una alta concentración de lactosa (Ramírez 2015).

Valencia (2008), informó que el suero debe acondicionarse antes de la fermentación para realizar una o más de las siguientes actividades: 1) hidrolizar su proteína para obtener una fuente de nitrógeno adecuada para promover el crecimiento y eliminar el suero; 2) la desmineralización, ya que es beneficiosa para ciertas levaduras y reduce el contenido de sal en el producto final; 3) hidrólisis de lactosa, porque es difícil de fermentar, pero aumentará los costos de procesamiento.

Metabolismo de los microorganismos

Las levaduras son microorganismos muy antiguos, por ende, son los mayormente estudiados y aceptados por los consumidores. Son utilizadas en la alimentación humana, ya que son raramente tóxicas o patógenas. A pesar de que su contenido de proteínas no excede el 60%, consta con aminoácidos esenciales tales como lisina, triptófano y treonina. Sin embargo, tiene bajo contenido de metionina y cisteína. Las levaduras son muy ricas en vitaminas y su contenido de ácidos nucleicos es bajo, en un rango de 4 -10% (Boze *et al.* 1995). Además del etanol, las levaduras pueden producir otros metabolitos como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Ejemplos de metabolitos primarios y secundarios producidos por ciertas levaduras.

	Metabolitos	Organismos	Utilización
Metabolitos primarios	Etanol	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Industria de las bebidas alcohólicas
	Riboflavina	<i>Ashbya gossipii</i>	Nutrición
	Vitamina B12	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Nutrición
Metabolitos secundarios	Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Antibiótico
	<i>Streptomycin</i>	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibiótico

Fuente: Kameswara Rao (2003).

Control de calidad del proceso de fermentación para producción de cerveza

Es importante destacar que toda la materia prima que se implementa para los procesos de fermentación debe ser de alta calidad para obtener la cerveza con los mayores estándares de calidad. El agua utilizada para el proceso de fabricación de la cerveza debe satisfacer todos los requerimientos generales de agua potable, cumpliendo con los requerimientos específicos para asegurar el debido pH de la masa, la debida extracción del lúpulo, buena coagulación durante la cocción, una correcta fermentación y el adecuado desarrollo de color sin dejar de lado el sabor de la cerveza terminada (Luna 2017).

La malta es la materia prima fundamental para el proceso de fermentación de la cerveza, proporciona enzimas y sustratos adecuados para el mosto. La malta debe proveer este extracto de manera fácil para que sea más eficaz el filtrado y clarificación del mosto. La composición del mosto es un factor fundamental en la calidad de fermentación por las levaduras, ya que esto juega un papel importante en el desarrollo del aroma y color en la estabilidad del producto final (Luna 2017). La malta se reconoce por sus beneficios y ventajas que tiene como aporte nutricional para el consumidor, presentando características completas, libre de bacterias patógenas, refrescantes, aporte nutricional para una mejor digestión además de ser un excelente diurético (Campi Saona 2016).

Producción de cerveza y su proceso de fermentación

La cerveza es una bebida alcohólica que se obtiene de la fermentación de cereales, principalmente de la cebada, trigo y mijo. Estos cereales se encuentran malteados en su mayoría. La cerveza fue un elemento importante en la dieta de varias civilizaciones como los egipcios, en donde se mencionan varios vestigios, también varios tipos de cerveza en textos Sumerios y Acadios. Los antiguos Griegos y Romanos conocían la cerveza, pero la apreciaban poco; en cambio, era la bebida de consumo habitual en Europa Occidental y Central desde aquellos tiempos (Dalby 2003).

Según Zanatta y Ferreira (2012), para la elaboración de la cerveza se requieren ingredientes como: agua, malta y lúpulo; además de varios procesos esenciales para su fabricación tales como: malteado del grano, maceración, cocción, fermentación, maduración, y segunda fermentación. Asimismo, existen varios tipos de cerveza según su fermentación. Las cervezas de alta fermentación producen aromas y sabores complejos, los cuales tienen acentuaciones más afrutadas y por lo general son oscuras y cremosas. Las cervezas de baja fermentación presentan sabores ligeros y son claras.

Alta fermentación. Las altas temperaturas ayudan a la producción de ésteres, que brindan notas frutales, asimismo los alcoholes superiores y otros subproductos no deseables. A los tres días empieza a enfriarse de modo gradual y durante las últimas 10 horas la fermentación es muy baja y la levadura flota hacia la superficie. Las cervezas de alta fermentación añaden cervezas como: Ale, Porter, Stout, Altbier, Kölsch y Wheat (Suárez 2013).

Baja fermentación. Las bajas temperaturas durante la primera fermentación favorecen la producción del diacetilo por el agotamiento de la valina dando resultado a que la levadura active la síntesis de productos intermedios generados por el diacetilo. Asimismo, el diacetilo otorga aroma y sabor de los caramelos de azúcar o a mantequilla que son indeseados. Las temperaturas más bajas de fermentación secundaria producen un proceso más lento pero el sabor de la cerveza es más limpio. Las cervezas de baja fermentación añaden cervezas como: Pilsener, Dortmunder, Märzen y Bock (Suárez 2013).

El proceso de la fermentación alcohólica para la obtención de la cerveza se lleva a cabo en 4 etapas importantes: Malteado, producción del mosto cervecero, fermentación y procesamiento final. Según Linko *et al.* (1998), cada parte del proceso tiene su paso determinante, en el malteado la germinación de la cebada, después la extracción e hidrólisis de los componentes de la cebada malteado con lúpulo, seguido de la fermentación principal y maduración, para llegar a la filtración, estabilización y embotellado.

Para el uso de lactosuero en la producción de cerveza se da un proceso previo al malteado, ya que el lactosuero brinda condiciones adecuadas para el posterior uso en la cerveza. Al aumentar la concentración de lactosa incrementa el sustrato fermentable dentro del suero, por tanto, el suero necesita de un previo tratamiento como el fraccionamiento, que corresponde a la separación de fragmentos individuales del material original complejo, esta separación de fracciones individuales purificadas de alto valor añadido a proteínas, al implementar procedimientos complejos de separación y extracción mediante tecnologías de separación como la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF), ósmosis inversa (RO), diafiltración (DF) (Berruga 1999). Para lograr producir la cerveza, se consideran 4 etapas, (Hernández y Sastre 2008):

Primera etapa. La preparación de la malta debe obtener un polvo rico en enzimas, para ello se debe germinar el grano de la cebada a una temperatura de 10 a 16 °C, con una humedad de 42 a 46 % alrededor de 60 horas aproximadamente. Una vez germinada la cebada, se procede a secar el grano, la temperatura depende de las características que se desea en la malta. Para maltas tipo Lager la temperatura oscila entre 55 a 70 °C y de 60 a 95 °C para maltas Ale. Una vez secado, se fragmenta el grano tostado para obtener la malta en polvo (López *et al.* 2002).

Segunda etapa. Para la producción del mosto con la malta en polvo se mezcla con la adición de entre un 10 a 20% de otros granos no germinados como arroz o maíz. Se mezcla todo con agua y esto proporciona un sabor ligero.

Se calienta la mezcla gradualmente hasta una temperatura de 48 °C por 20 minutos en donde se activan las enzimas como: proteasas, β - glucanasas y β - amilasas. Posterior, se eleva la temperatura hasta los 60 °C por 30 minutos con el objetivo de activar principalmente la amilasa. Esta solución es filtrada y se lleva a ebullición por una hora con la adición de lúpulo para obtener el mosto dulce (López *et al.* 2002).

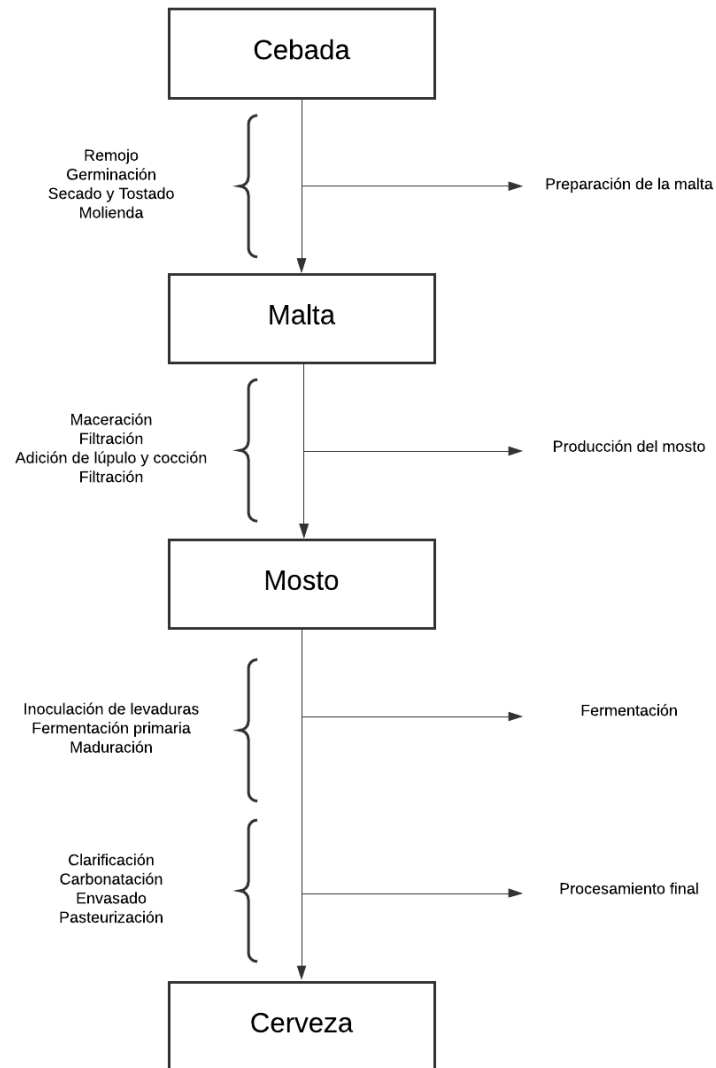


Figura 3. Proceso de elaboración de cerveza (Hernández y Sastre. 2008).

Las enzimas proteasas se encargan de hidrolizar las proteínas de la malta, dando a la formación de aminoácidos y péptidos que en la fermentación servirán como nutrientes para la levadura. Las enzimas β -glucanasas se encargan de hidrolizar los glucanos presentes en la cebada, estos polímeros disminuyen la viscosidad del mosto. Las enzimas β -amilasas hidrolizan la amilosa y amilopectina formando maltosa y dextrinas. Según Vincent *et al.* (2006), las amilasas se activan entre los 60 a 70 °C hidrolizando los enlaces alfa 1-4 de la amilosa y amilopectina en diferentes puntos del polímero sin acercarse a los extremos de la cadena y puntos de ramificación.

La cocción del mosto tiene siete objetivos importantes:

- Se concentran los sólidos del mosto.
- Extracción de los componentes del lúpulo.

- Inactivación de las enzimas de la malta.
- Esterilización del mosto.
- Descarte de los compuestos volátiles indeseables.
- Reacción de Maillard deseable.
- Coagulación de proteínas y correlación con taninos en favor de compuestos insolubles para clarificación del producto (Varnan y Sutherland 1997):

Después de filtrar la solución ya enfriada se obtiene un mosto compuesto por carbohidratos fermentables, aminoácidos y minerales, este mosto equilibrado sirve como sustrato para el crecimiento de levaduras y la producción de etanol, así mismo es una fuente de aroma y sabor (Varnan y Sutherland 1997).

Tercera etapa. En la elaboración industrial de la cerveza se emplean dos clases diferentes de fermentación: alta y baja. La fermentación alta, que se aplica a cervezas tipo “Ale”. Durante el proceso de fermentación, las levaduras se concentran y estas flotan en el líquido o pueden flocular a inicios de la fermentación y hundirse el líquido. La fermentación baja, que se aplica a cervezas tipo “Lager”, durante este proceso los flóculos de levadura flotan al finalizar el proceso, así mismo la concentración se hunde en el líquido (Varnan y Sutherland 1997). Estas fermentaciones funcionan en diferentes tiempos y temperaturas, no obstante, ambas se llevan a cabo en dos pasos.

Según Linko *et al.* (1998) la primera fermentación se la denomina de esa forma solo fermentación y la fermentación secundaria es conocida como maduración. Durante la fermentación primaria se lleva al mosto a temperaturas de 15 a 22 °C para cervezas ligeras como “Ale” y temperaturas de 7 a 15 °C para cervezas “Lager”, en esta etapa es donde las levaduras metabolizan a los carbohidratos generando etanol y CO₂. En cuanto a la maduración o fermentación secundaria, se somete al mosto fermentado a temperaturas bajas desde 4 a 10 °C por 5 a 10 días, en esta etapa también adiciona característica de olor, color, sabor y brillantez a la cerveza (Varnan y Sutherland 1997; López *et al.* 2002; Hernández 2003).

Cuarta etapa. Para procesamiento final una vez concluida la maduración, se clarifica la cerveza, es carbonatada, envasada y pasteurizada para su respectiva distribución. El envasado de la cerveza se realiza normalmente después de que haya sido pasteurizada. Dependiendo del productor, envasado con botellas de diferentes materiales, se puede pasteurizar dentro del envase (Suárez Díaz 2013).

Bebidas saborizadas con uso de lactosuero

La realización de bebidas a base de lactosuero necesita la mezcla apropiada y mínimamente procesada de frutas con la selección y uso de estabilizadores adecuados, asimismo, el uso de acidulantes para elaborar una bebida a base de suero y frutas (Krasaekoopt y Lokuliyange 2011). Las propiedades nutricionales que brinda el lactosuero y la pulpa de maracuyá como lo menciona García *et al.* (2015), aporta un uso diferente al suero brindándole un valor que genera un beneficio al procesador, asimismo existen diferentes estudios en bebidas fermentadas y saborizadas con uso de lactosuero.

Un estudio realizado por Singh y Singh (2012), sugiere la utilización de suero de leche para la producción de una bebida saborizada con mango, destacando los atributos sensoriales, sabor, apariencia y aroma usando concentraciones de pulpa de mango, estabilizadores y sacarosa. Destacando que el lactosuero puede ser usado para desarrollar bebidas de bajo costo con gran aporte nutritivo.

Con el uso de lactosuero se puede llevar a cabo un proceso de fermentado para la obtención de una bebida alcohólica, también existen estudios en los que se realizan bebidas saborizadas para aprovechar al máximo su uso, ya que como se menciona tiene gran aporte nutricional y en conjunto con la adición, ya sea de frutas o su vez levaduras que trabajen en conjunto le aporta al producto un valor agregado que hace que el suero se convierta en un subproducto de gran beneficio para la industria.

Factores influyentes para la producción de etanol según la literatura

En un estudio realizado por Jácquez *et al.* (2015), donde se evaluaron ocho fermentaciones con duplicado y utilizando un diseño experimental Plackett-Burman, se evaluaron las variables implicadas en el proceso de producción de etanol como: agitación (150 y 250 rpm), pH (3.8 y 4.8), C_{fn} $(NH_4)_2SO_4$ (300 y 900 mg/L), concentración de inóculo (1×10^6 y 1×10^7 cel/mL), temperatura (28 y 37 °C), tratamiento (pasteurizado y crudo) y tipo de lactosuero (directo y desproteinizado). Se tomaron muestras a las 0, 6 y 12 horas, posteriormente, cada 12 horas hasta las 72 horas. Las cinéticas de fermentación fueron evaluadas en función de consumo de lactosa y producción de etanol. En la Figura 4, se presenta un diagrama de Pareto con los efectos estandarizados en la producción de etanol (Jácquez *et al.* 2015).

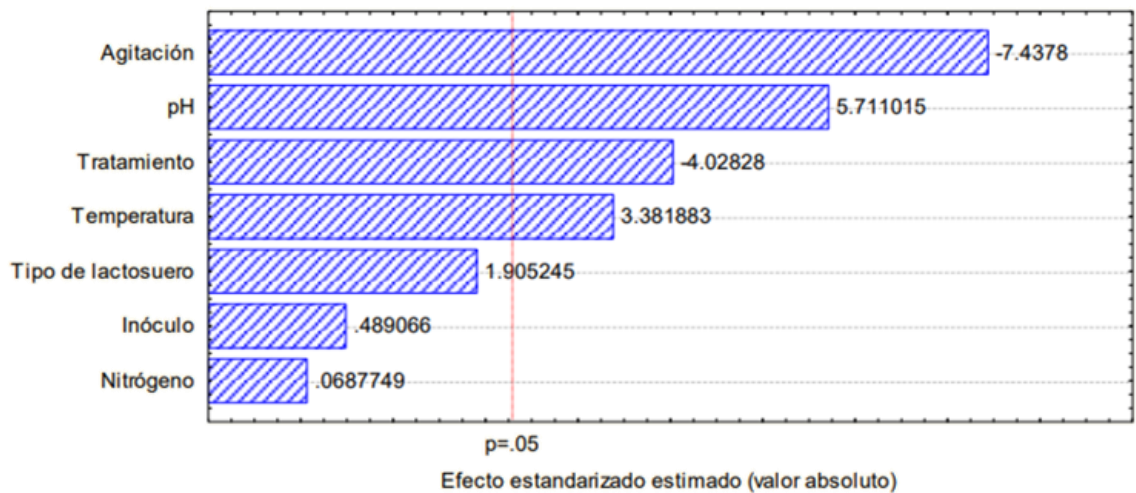


Figura 4. Diagrama de Pareto de los efectos principales a un nivel de confianza del 95% (Jácquez *et al.* 2015).

Según Jácquez *et al.* (2015), en el diagrama de Pareto de la Figura 4, se identifican las variables que obtuvieron una alta influencia ($p < 0.05$). Las variables más influyentes en el proceso de fermentación fueron: agitación y tratamiento en sus niveles inferiores, correspondiente a 150 rpm

y pasteurizado, en cambio, en niveles superiores, pH (4.8) y temperatura (37 °C) fueron las variables que obtuvieron mayor influencia sobre la producción de etanol.

El lactosuero es un subproducto del cual se puede obtener valor agregado al crear una bebida alcohólica o bebidas saborizadas. Asimismo, existen varios factores que determinan la capacidad de llevar a cabo este proceso y es importante destacar como lo menciona Lawton y Alcaine (2019), que a la lactosa se le puede usar como un producto adjunto como fuente de azúcar fermentable en la producción de etanol, ya que, sin el uso de cebada u otros granos, por sí solo el lactosuero no produce el valor teórico de etanol cuando se realiza la fermentación con uso de *Sacharomyces cerevisiae*.

Cuadro 3. Análisis de varianza de los factores que influyen en la producción de etanol a partir de lactosuero.

Factor	SS	df	MS	F	P
Agitación	14.1508	1	14.1508	11.43713	0.009615
pH	68.4467	1	68.4467	55.32093	0.000073
Tratamiento	0.0059	1	0.0059	0.00473	0.946857
Temperatura	40.3543	1	40.3543	32.61569	0.000449
Tipo de lactosuero	4.4912	1	4.4912	3.62996	0.093212
Inóculo	20.0771	1	20.0771	16.22701	0.003797
Nitrógeno	0.2959	1	0.2959	0.23919	0.637921
Error	9.8981	8	9.8981		
Total SS	157.7199	15			

Fuente: Jácquez *et al.* (2015).

Es importante destacar las funciones que cumplen los factores mencionados en el Cuadro 3, en la producción de etanol, principalmente la temperatura y el pH, como lo menciona Santos *et al.* (1998) y Hatzinikolaou *et al.* (2005) que estos factores afectan directamente en la desnaturalización de las proteínas. En la Figura 5 se muestra la concentración de etanol (v/v) del estudio realizado por López y Prado (2015), en donde se señala el volumen de etanol correspondiente al obtenido después de la purificación y el volumen del lactosuero para la fermentación. En dicho estudio la concentración de etanol (v/v) demuestra un coeficiente de relación con resultados de 0.999, indicando correlación lineal en los datos, asimismo, precisión y confiabilidad.

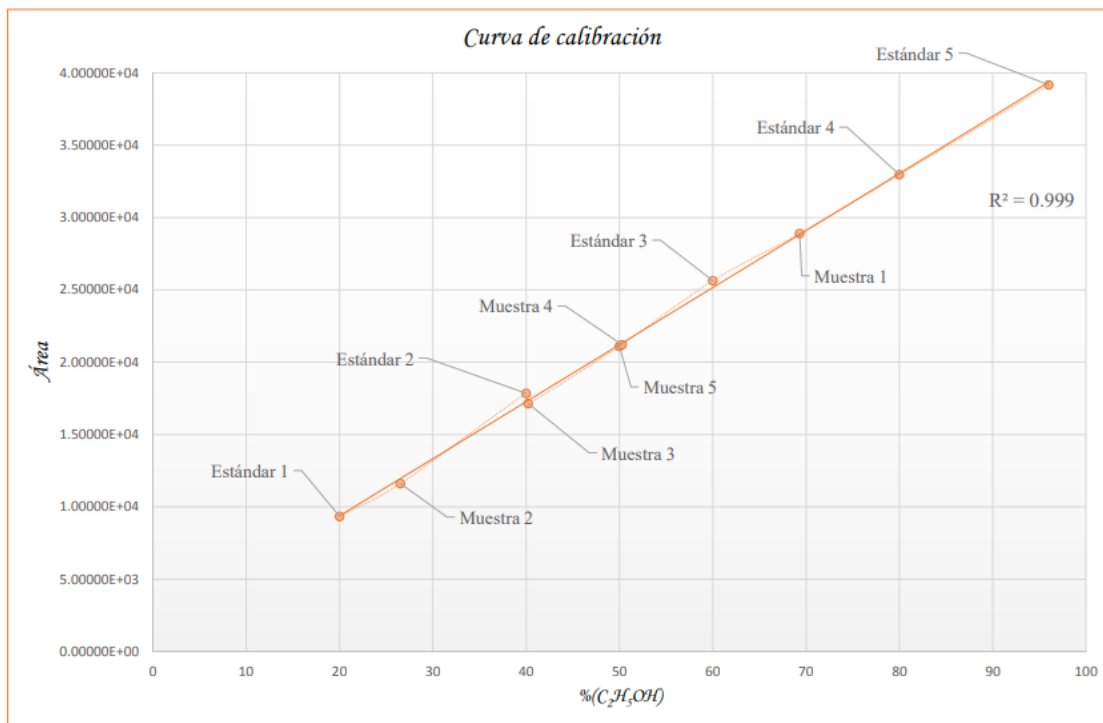


Figura 5. Concentración en porcentaje de etanol (López & Prado 2015).

El volumen de etanol corresponde al obtenido después de la purificación y el volumen del lactosuero utilizado para la fermentación, por tanto, se determinó mediante la Ecuación 3.

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{\text{volumen del etanol}}{\text{volumen de lactosuero}} \right) \times 100 \quad [3]$$

Los cálculos del porcentaje de rendimiento para cada una de las muestras se presentan en el Cuadro 4, el cual presenta el rendimiento en porcentaje obtenido de etanol de cada muestra utilizando la fórmula mencionada anteriormente.

Cuadro 4. Cálculo del porcentaje de rendimiento para la obtención de etanol.

Muestra	Volumen de etanol mL	Volumen de lactosuero mL	% Rendimiento
M1	52	925	5.6212
M2	40	925	4.3243
M3	50	925	5.4054
M4	51	925	5.5135
M5	51	925	5.5135

Fuente: López & Prado (2015).

Según López y Prado (2015), desde el punto de vista industrial el rendimiento del proceso es bajo y a una empresa no le conviene generar este producto por la remuneración obtenida ya que en el estudio se usó como levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El porcentaje de rendimiento en los volúmenes de etanol obtenido de la fermentación son pobres, en referencia al volumen usado de lactosuero fermentado y la cantidad de etanol producido no cumple con el rendimiento esperado.

Como lo menciona Hughes *et al* (2018), una manera de aprovechar en su totalidad el lactosuero es concentrar el suero y separar el etanol de otros compuestos volátiles, de esta manera se aumentará el rendimiento y las concentraciones de etanol.

En otro estudio realizado por Lawton & Alcaine (2019)., se ha aprovechado la presencia de las enzimas endógenas (β -galactosidasa y β -glucosidasa) que se encuentran en la cebada, las cuales permiten realizar el desdoblamiento de la lactosa durante el proceso de maceración y antes de la fermentación. Esto solventa el problema principal de no poder utilizar lactosa para la producción de etanol, ya que una vez desdoblada la lactosa en sus azúcares simples, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede realizar la fermentación alcohólica.

4. CONCLUSIONES

- Se realizó una revisión de literatura que recopiló 98 referencias distribuidas en 78 revistas científicas, 11 libros y 9 páginas web.
- De acuerdo a la literatura citada, antes de utilizar el lactosuero como ingrediente para la fermentación alcohólica, se debe realizar un pretratamiento de membranas para eliminar componentes no deseados y concentrar la cantidad de lactosa.
- Se describió el flujo de proceso para la fermentación de lactosuero en la producción de bebidas fermentadas.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio científico de relación costo-beneficio y valor agregado en el desarrollo de una bebida alcohólica tipo cerveza con el uso de lactosuero con diferentes tiempos de fermentación e hidrólisis.
- Proponer diferentes aplicaciones al lactosuero como materia prima o adjunto en procesos industriales con el fin de tratar este residuo y presentar ofertas de utilidad y valor agregado a empresas que dispongan a dar utilidad al lactosuero.
- Usar el lactosuero como producto adjunto en sinergia con cebada (*Hordeum vulgare*) en la producción de etanol con levaduras capaces de hidrolizar la lactosa.

6. LITERATURA CITADA

- Alcívar-Bravo A, Barreiro-Cobeña J, Navia-Mendoza J, Velásquez-Bazurto S, Vinces-Muñoz W. Obtención de alcohol a partir de la fermentación anaerobia del mosto de uva. Revista científica multidisciplinaria arbitrada "Yachasun". 2019;3(5):1–7. doi:10.46296/yc.v3i5.0015.
- Ali, H. K. Q., & Zulkuli, M. M. D. 2011. Application of Plackett-Burman design for screening the media components for citric acid production from paddy straw using solid-state fermentation. *International Journal of ChemTech Research* 3. (2): 1015-1019.
- Almeida, M. J.; Pais, C. S. (1996): Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. In *Letters in Applied Microbiology* 23 (3), pp. 154–158. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb00053.x.
- Avila, Rita M., Cárdenas, Antonio, Medina, Ana L. 2000. Tratamiento del lactosuero utilizando la técnica de electrodiálisis. *Interciencia* [en línea]. 2000, 25(2), 80-84[consultado el 7 de oct. de 2020]. ISSN: 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33904405>
- Aymerich, S. 2000. Tratamiento de residuos lácteos. Conceptos para el tratamiento de residuos lácteos. Consejo Nacional de Producción (CNP), Dirección Mercadeo y Agroindustria, San José.
- Bansal, N., & Bhandari, B. 2016. Functional milk proteins: Production and utilization—whey-based ingredients. Fourth edition. New York. O'Mahony, editors. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_3
- Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U, Pankova L, Danilevics A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*. 2002;38(5):701–706. doi:10.1016/S0032-9592(02)00189-9.
- Berruga Fernández, M. E. 1999. Desarrollo de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería. [Tesis]. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. [Consultado el 9 de ago. de 2020]. <https://eprints.ucm.es/3062/1/T23555.pdf>
- Berruga MI, Jaspe A, SanJose C. Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1997;40(2-4):119–123. doi:10.1016/S0964-8305(97)00053-X.
- Blaschek KM, Wendorff WL, Rankin SA. Survey of salty and sweet whey composition from various cheese plants in Wisconsin. *Journal of dairy science*. 2007;90(4):2029–2034. eng. doi:10.3168/jds.2006-770.
- Burke, S., B. Edmunds, and B. Love. 2015. Kettle souring: Three brewers talk methods and practices. *Conf. Prog. Craft Brewers*. 2015. Portland, OR. Conf. BrewExpo America.
- Campi Saona, E. D. 2016. Análisis de la interpretación del semáforo alimenticio en los productos de bebidas no alcohólicas en la línea de maltas en la escuela particular Cayetano Tarruell de la parroquia Ximena cantón Guayaquil año 2016. Universidad Laica VICENTE

- ROCAFUERTE de Guayaquil. Ecuador. 100p. [Consultado el 7 de jul. de 2020]. <http://repositorio.ulvr.edu.ec/handle/44000/1209>
- Carvajal Martínez, L. D., & Insuasti Andrade, M. A. 2011. Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (*Hordeum vulgare*) y yuca (*Manihot esculenta crantz*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE. Ecuador. 164p. [Consultado el 4 de jul. de 2020]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/558>
- Christensen AD, Kádár Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2011;38(2):283–289. eng. doi:10.1007/s10295-010-0771-0.
- Crueger W, Crueger A. *Biología: Manual de microbiología industrial*. Zaragoza, España: Acribia; 1993. xvii, 413. ISBN: 8420007439.
- Dalby, A. 2003. *Food in the Ancient World from A to Z*. First edition. London. Routledge Taylor and Francis group. [Consultado el 7 de jul. de 2020]. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=RXpm47Wr49EC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Dalby,+A.+2003.+Food+in+the+Ancient+World+from+A+to+Z.+Psychology+Press.&ots=PxQjLZxSDX&sig=CWYviiy7B5KD1Kwwc78Jxz_9ntQ#v=onepage&q=Dalby%2C%20A.%202003.%20Food%20in%20the%20Ancient%20World%20from%20A%20to%20Z.%20Psychology%20Press.&f=false
- Dragone G, Mussatto SI, Oliveira JM, Teixeira JA. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*. 2009;112(4):929–935. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.005.
- Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán MJ, García-Maiquez E, Uruburu F, Querol A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(5):2056–2061. eng. doi:10.1128/AEM.67.5.2056-2061.2001.
- García Bazante, K. B. 2015. *Elaboración de cerveza artesanal a partir de almidón extraído de tubérculos andinos*. [Tesis de pregrado]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- García-Mogollon C, Alvis-Bermudez A, Romero P. 2015. Aplicación del Mapa de Preferencia Externo en la Formulación de una Bebida Saborizada de Lactosuero y Pulpa de Maracuyá. *Inf. tecnol*. 2015;26(5):17–24. doi:10.4067/S0718-07642015000500004.
- Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., & Canales, A. L. M. 1993. *Biología alimentaria*. Quinta edición. México. Editorial Limusa. [Consultado el 5 de ago. De 2020]. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=2ctdvBnTa18C&oi=fnd&pg=PA11&dq=Garc%C3%ADa+Garibay,+M.,+Quintero+Ramirez,+R.,+%26+L%C3%B3pez-Mungu%C3%ADa+Canales,+A.+2004.+Biolog%C3%ADa+alimentaria.&ots=_sw32gxyDh&sig=IGNMdaU4Q8cnWuTOdF9Z-WWiPYs#v=onepage&q&f=false
- Gough S, Flynn O, Hack CJ, Marchant R. 1996. Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: simplex optimisation of media supplements. *Applied microbiology and biotechnology*. 1996;46(2):187–190. eng. doi:10.1007/s002530050803.

- Harju M, Kallioinen H, Tossavainen O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*. 2012;22(2):104–109. doi:10.1016/j.idairyj.2011.09.011.
- Hashimoto, T., Maruhashi, T., Yamaguchi, Y., Hida, Y., & Oka, K. 2012. The effect on fermentation by-products of the amino acids in wort. In *Proceedings of the World Brewing Congress*. Julio-Agosto 2012. Portland, OR. Master Brewers Association of the America.
- Hatzinikolaou DG, Katsifas E, Mamma D, Karagouni AD, Christakopoulos P, Kekos D. Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 2005;24(2):161–172. doi:10.1016/j.bej.2005.02.011.
- Headon, D. R., & Walsh, G. A. 1993. Activity analysis of enzyme under field conditions. In *Enzymes in Animal Nutrition. Proceedings of the 1st Symposium*. Kartause, Switzerland. pp. 233-240.
- Hernández Rodríguez M. *Tratado de nutrición*. España: Ediciones Díaz de Santos; 2008. 1 online resource (1427). ISBN: 84-7978-387-7.
- Hernández, P.A. 2003. *Microbiología industrial*. 1ª Ed. Costa Rica. Editorial EUNED. [Consultado el 25 de Agosto De 2020]. <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&rview=1#v=onepage&q&f=false>
- Hughes, P., Risner, D. y Goddik, LM. 2018. Suero a Vodka. En *suero: propiedades biológicas y usos alternativos*. London. IntechOpen. [Consultado el 09 de Agosto De 2020]. <https://www.intechopen.com/books/whey-biological-properties-and-alternative-uses/whey-to-vodka>
- Jáquez-Velázquez, L., Soto-Cruz, N. O., Rutiaga-Quñones, O. M., & Páez-Lerma, J. B. 2015. Evaluación de las variables de fermentación para la producción de etanol a partir de lactosuero. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 21 al 26 de Junio 2015. Guadalajara México.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2009. *Microbiología moderna de los alimentos*. 5{487} ed. Zaragoza: Acribia; 2009? XIII, 767. ISBN: 978-84-200-1125-7.
- Jelen, P. 2003. Whey processing: utilization and products. H. Roginski, JW Fuquay and PF Fox (eds.), 2003, p. 2739-2745.
- Jeličić, I., Božanić, R., & Tratnik, L. 2008. Whey based beverages-new generation of dairy products.[Consultado el 7 de agosto De 2020]; 58(3), 257-274. https://bib.irb.hr/datoteka/394334.58_3_Sirutkini_napici.pdf
- Kamei C, Masuda Y, Oka M, Shimizu M. Effects of antidepressant drugs on amygdaloid after-discharge in rats. *Jpn J Pharmacol*. 1975;25(4):359–365. eng. doi:10.1254/jjp.25.359.
- Kapoor R, Metzger LE. 2004. Evaluation of Salt Whey as an Ingredient in Processed Cheese. *Journal of dairy science*. 2004;87(5):1143–1150. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73262-2.
- Krasaekoopt, W., & Lokuliyana, T. 2011. Effect of hydrocolloids on sensory properties of the fermented whey beverage from different types of milk. *AU JT*. 14(4), 253-258.

- Lawton, M. R., & Alcaine, S. D. 2019. Leveraging endogenous barley enzymes to turn lactose-containing dairy by-products into fermentable adjuncts for *Saccharomyces cerevisiae*-based ethanol fermentations. *Journal of dairy science*. 102(3), 2044-2050.
- Lee BH. Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia; 2000. xv, 475 (Biotecnología). ISBN: 978-84-200-0922-3.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. 2000. Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial. Editorial ACRIBIA. SA p, 3-88.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A. y Penttilä, M. 1998. Avances recientes en la industria de la malta y la elaboración de cerveza. *Journal of Biotechnology*. 65 (2-3), 85-98.
- Liu, X., K. Chung, S. Yang and A. Yousef. 2005. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry*. 40: 13-24.
- Londoño Uribe, Margarita María, Sepúlveda Valencia, José Uriel, Hernández Monzón, Aldo, Parra Suescún, Jaime Eduardo. 2008. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Medellín [en línea]. 2008, 61(1), 4409-4421 [fecha de Consulta 7 de Octubre de 2020]. ISSN: 0304-2847. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914077017>
- López Rivas, J. J., & Prado Arróliga, J. L. 2015. Uso de lacto suero en Sinergia con *Sacharomyces Cerevisae* como materia prima para la producción de Etanol a escala piloto, en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-agosto 2015. [Tesis de pregrado]. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- López, A., García, G.M., Quintero, R.R., López-Munguía A., Canales, I. 2002. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México. pp. 263-312.
- Luna, L. B. 2017. Manual de control de calidad de la Cervecería Gourmet del Golfo SA de CV. Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz. México. 42p. [Consultado el 4 de jul. de 2020]. <http://reini.utcv.edu.mx/handle/123456789/294>
- Mawson, A. J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresour. Technol.* 47:195–203.
- Mawson, J. 2003. Fermentation of Whey. pp. 6157-6163. In: Caballero, B. (ed.). *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. Second edition. Academic Press, London.
- McGovern PE. *Uncorking the past: The quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*. Berkeley: University of California Press; 2009. xv, 330. ISBN: 978-0-520-25379-7.
- Mogrovejo Dávila, P. K., & Urgiles Jumbo, G. D. C. 2009. Optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando B-galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual. [Tesis de pregrado]. Ecuador: Universidad del Azuay.
- Montesdeoca, R., Intriago, R., Vera, P., & Benítez, I. 2018. Efecto de la adición de lactasa y sacarosa en una bebida isotónica utilizando lactosuero. *Revista chilena de nutrición*. 45(4), 316-322.

- Muñi, A., G. Paez, J. Faría, J. Ferrer y E. Ramones. 2005. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica*. 15(4): 361–367.
- Muñoz, M., & Catrilaf, G. 2013. Estimación de parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en sistema de fermentación batch bajo distintas condiciones de crecimiento. Santiago Chile. [Consultado el 15 de jul. de 2020]. https://www.researchgate.net/profile/Miguel_Munoz_Flores/publication/257310255_Estimation_of_kinetic_parameters_of_Saccharomyces_cerevisiae_in_batch_fermentation_during_different_growth_conditions/links/00463524e576d9f2fc000000/Estimation-of-kinetic-parameters-of-Saccharomyces-cerevisiae-in-batch-fermentation-during-different-growth-conditions.pdf
- Navarro, A., H. Marangoni, D. y C. Callier. 1986. Producción de etanol por fermentación con alta concentración de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*. 18 (1): 7-11.
- Oleary, V. S., R. Green, B. C. Sullivan, and V. H. Holsinger. 1977. a. Alcohol production by selected yeast strains in lactase-hydrolyzed acid whey. *Biotechnol. Bioeng.* 19:1019–1035.
- Osburn, K., Amaral, J., Metcalf, S. R., Nickens, D. M., Rogers, C. M., Sausen, C., & Bochman, M. L. 2018. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiology*. 70, 76-84.
- Owais, M. y S. Zafar. 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*. 27 (2006) 295–298.
- Padín González, C., & Díaz Fernández, M. 2009. Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29(2), 110-116.
- Padín González, Carmiña, & Díaz Fernández, Mario. 2006. Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 26(1), 35-41. Recuperado en 09 de octubre de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562006000100008&lng=es&tlng=es
- Panesar P, Kennedy J, Gandhi D, Bunko K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 2007;105(1):1–14. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.035.
- Pares, R. y Juárez, A. 1997. *Bioquímica de los Microorganismos*. Editorial Reverté. España. pp. 16-20.
- Parra, R. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Medellín. Vol. 62. 0304-2847.
- Pedroza, A. 1999. Producción de amilasa termoestable a partir de *Thermus sp*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia. 9p. [Consultado el 15 de ago. De 2020]. <https://www.redalyc.org/pdf/693/69380202.pdf>
- Puente Moncayo, S. D. 2018. Elaboración de una bebida alcohólica a partir de suero de leche dulce proveniente de queso fresco y mora (*Rubus glaucus benth*). [Tesis de pregrado]. Ecuador: Universidad de las Américas.

- Rajendran, A., Thirugnanam, M., & Thangavelu, V. 2007. Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. NISCAIR. [Consultado el 3 de jul. de 2020]; 469-478. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/3090>
- Ramakrishnan, S., & Hartley, B. S. 1993. Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Applied and environmental microbiology*. 59(12), 4230-4235.
- Ramírez, J. E. G., de Lira, R. F., Martínez, R. C., & Salgado, J. L. M. 2013. Perspectivas de nuevos productos a base de amaranto: Cerveza artesanal de amaranto. *Tlatemoani: revista académica de investigación*. (14), 6.
- Ramírez-Navas, J. S. 2015. Diseño de procesos en Industria Láctea: Transformación de lactosuero. Libros Editorial UNIMAR.
- Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L., & Tribe, D. E. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. 23a Ed. Berlin, Heidelberg. Springer, [24 de jul. de 2020]. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3540116982_2
- Roginski H, Fuquay JW, Fox PF. *Encyclopedia of dairy sciences*. Amsterdam, London: Academic Press; 2003. ISBN: 0-12-227235-8.
- Roy, J. K., Borah, A., Mahanta, C. L., & Mukherjee, A. K. 2013. Cloning and overexpression of raw starch digesting α -amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant α -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 97, 118-129.
- Sánchez, N., Ramírez, D. M., & Zapata, A. D. 2007. Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato. *Vitae*, 14(2), 27-34.
- Sánchez, Óscar Julián, & Cardona, Carlos Ariel. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante II: integración de procesos.. *Interciencia*, 30(11), 679-686. Recuperado en 09 de octubre de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100006&lng=es&tlng=es
- Santana, M., E. Rolim, R. Carreiras, W. Oliveira, V. Medeiros and M. Pinto. 2008. Obtaining oligopeptides from whey: Use of subtilisin and pancreatin. *American Journal of Food Technology*. 3(5): 315-324.
- Santos, A., Ladero, M., & García-Ochoa, F. 1998. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 22(7), 558-567.
- Schmoldt A, Benthe HF, Haberland G. Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochemical pharmacology*. 1975;24(17):1639–1641. eng.
- Seo, J. S., Chong, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Jung, C., Kim, J. J., ... & Park, C. J. 2005. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature biotechnology*. 23(1), 63-68.
- Shahhoseini, M., Ziaee, A. A., & Ghaemi, N. 2003. Expression and secretion of an α -amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. *Journal of applied microbiology*. 95(6), 1250-1254.

- Singh, A. K., y Singh, K. (2012). Utilization of whey for the production of instant energy beverage by using response surface methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 4(2), 103-111.
- Smith, S., Smith, T. J., & Drake, M. A. 2016. Flavor and flavor stability of cheese, rennet, and acid wheys. *Journal of Dairy Science*. 99(5), 3434-3444.
- Socorro, M., y Verdalet, I. 2013. El suero de queso: ¿Producto vital o simple desecho? *La Ciencia y el Hombre* 2005; 17 (2): 53-4.
- Spellman, D., G. O’Cuinn and R. FitzGerald. 2009. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins. *Food Chemistry*. 114(2): 440–446.
- Stanier, R., Villanueva, J., Guerrero, R. 1996. *Microbiología*. Segunda edición. Editorial Reverté. España. pp. 200-213.
- Suárez Díaz, M. 2013. *Cerveza, componentes y propiedades*. [Tesis de pregrado] España: Universidad de Oviedo.
- Sutherland, B. J. 1974. Control of salt absorption and whey drainage in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*. 29(2), 86.
- Terán, J. C., Paez, R., Pirola, M. B., & Schmidt, E. 2011. Características generales sobre el uso del suero de queso en la Provincia de Santa Fe. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). [Consultado el 9 de jul. de 2020]. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publicacion__gestion_del_suero-inta-inti.pdf
- Tortora G, Funke BR, Case CL. *Introducción a la microbiología*. 9a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007. xxviii, 959. ISBN: 978-950-06-0740-7.
- Trevan MD. *Biotecnología: Principios biológicos*. Zaragoza: Acribia; 1990. xiii, 284. ISBN: 84-200-0671-8.
- Uhlig H. *Industrial enzymes and their applications*. New York, Chichester: Wiley; 1998. ISBN: 0-471-19660-6. eng ger.
- Valencia, J. 2008. El Suero de Quesería y sus Posibles Aplicaciones (Parte 2/3). *Mundo Lácteo y Cárnico*. 5(1), 16-18.
- Valenzuela Venegas, R. A. 2007. *Elaboración artesanal de cerveza orgánica de quínoa*. [Tesis de pregrado]. Chile: Universidad de Chile.
- Van der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*. 94(2), 137-155.
- Varnan, A.H. y Sutherland, J.P. 1997. *Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología*. Editorial Acribia. España. pp. 307-372.
- Vázquez, H.J. y Dacosta, O. 2007. “Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas”. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 8(4), 249-259.
- Vincent, V.M.C., Álvarez, B.S., Zaragozá, C.J.L. 2006. *Química industrial orgánica*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 67-93.

- Vincenzi A, Maciel MJ, Burlani EL, Oliveira EC, Volpato G, Lehn DN, Souza CFV. Ethanol Bio-Production from Ricotta Cheese Whey by Several Strains of the Yeast *Kluyveromyces*. *American J. of Food Technology*. 2014;9(6):281–291. doi:10.3923/ajft.2014.281.291.
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., & Sone, H. 2002. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*. 59(4-5), 501-508.
- Zanatta K, Ferreira A. 2012. *Sommelier de cerveza* [internet]. Sao Paulo (Brasil): Instituto de la cerveza; [consultado 2020 Jul 3]. <https://instituto.beer/cursos/beer-sommelier/>
- Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. 2017. Microbial α -amylase: A biomolecular overview. *Process Biochemistry*. 53, 88-101.