



Artículo original

Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*

Carmiña Padín González^{a,*}, Mario Díaz Fernández^b

^aLaboratorio Botánica I y Laboratorio LIADSA/CIB. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro Estado Falcón, Venezuela

^bLaboratorio de Biotecnología de la Universidad de Oviedo, Asturias, España

Recibido 14 de octubre de 2005; aceptado 15 de noviembre de 2005

Resumen: El lactosuero es un subproducto de la separación de la cuajada de la leche durante el proceso de fabricación del queso y es considerado un problema para la industria quesera por su alto poder contaminante ya que contiene de 42 -52 g/l de lactosa. En este trabajo se plantea al aprovechamiento de lactosuero como sustrato para llevar a cabo un proceso de fermentación alcohólica utilizando *Kluyveromyces fragilis*. Se estudió el efecto de la concentración inicial del lactosuero, (7, 10, 15, 20 % p/p.), sobre la fermentación alcohólica por *K. fragilis*. Se determinó la biomasa, consumo de azúcar, producción de etanol y rendimientos globales del proceso. Se encontró que la velocidad específica de crecimiento disminuyó, mientras que la concentración máxima de biomasa (fase estacionaria) fue la misma, y el tiempo de duplicación celular (t_d) se incrementó, al aumentar la concentración inicial de lactosuero $[S]_0$. El consumo de lactosa aumentó cuando la concentración inicial de lactosuero era más alta, $[S]_0$, pero, la lactosa residual fue mayor. La levadura dio lugar a mayor cantidad de etanol cuando la $[S]_0$ fue mayor, sin embargo un aumento en la $[S]_0$ no reflejó un aumento en el rendimiento y productividad del proceso. En cada uno de los ensayos se utilizó la misma concentración celular inicial (inóculo) alcanzando un mismo aumento en la fase estacionaria independientemente de la creciente concentración de lactosa en el medio, evidenciándose una inhibición debido probablemente a la concentración máxima de etanol tolerado. Se recomienda que las fermentaciones sean llevadas a cabo en concentraciones de lactosuero menores de 15% (96 g/l de lactosa) bajo las mismas condiciones experimentales ó la utilización de técnicas de ingeniería de separación, que permita eliminar la inhibición por producto metabólico y mantener alta productividad de etanol.

Palabras clave: Lactosuero, fermentación alcohólica, *Kluyveromyces fragilis*

Effect of the initial concentration of whey on the alcoholic fermentation by *Kluyveromyces fragilis*

Abstract: Whey is a subproduct of the separation of curd during cheese fabrication and is considered a problem for the cheese industry because of its highly contaminating power since it contains from 42 to 52 grams of lactose per liter. This study proposes the use of whey as a substratum to carry out an alcoholic fermentation process using *Kluyveromyces fragilis*. The effect of the initial whey concentration (7, 10, 15, 20% p/p), on the *K. fragilis* alcoholic fermentation was studied, and biomass, sugar consumption, ethanol production and global yielding of the process was determined. It was found that the specific growth rate decreased while the maximum biomass concentration (the stationary phase) did not vary and the cellular duplication time (t_d) increased as the initial whey concentration $[S]_0$ did. The consumption of lactose was higher when the initial whey concentration $[S]_0$ was greater, but the residual lactose increased as well. The yeast generated a greater amount of ethanol when $[S]_0$ was higher. However, a rise in $[S]_0$ did not reflect a yielding and productivity increase of the process. In each test, the same initial cellular concentration (inoculum) was used, reaching the same increase in the stationary phase regardless of the increasing environmental lactose concentration. This was an evidence of an inhibition probably due to the maximum tolerated ethanol concentration. It is recommended to carry out fermentations at concentrations below 15 (96 grams per liter of lactose) under the same experimental conditions or use engineering separation techniques that prevent metabolic product inhibition and allow preservation of high ethanol productivity.

Keywords: Whey, alcoholic fermentation, *Kluyveromyces fragilis*

* Correspondencia:

E-mail: cpadin@cantv.net

Introducción

El lactosuero es la fase acuosa separada de la cuajada en el proceso de elaboración del queso y representa el 80 - 90 % del volumen total de la leche que entra en el proceso y contiene alrededor de 50% de los nutrientes de la leche original: proteínas solubles, lactosa, grasa, vitaminas y sales minerales. El contenido en lactosa está entre 42 y 52 g/l, representando este el 70% del contenido total del conjunto sólidos presentes [1]. El lactosuero es, uno de los desechos más contaminantes de la industria de alimentos ya que por cada Kg. de queso elaborado se crean 9 litros de suero, estimando que anualmente a nivel mundial se generan 110 millones de toneladas [2]. Cada 1.000 litros de lactosuero generan cerca de 35 Kg. de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 Kg. de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas [3].

La producción quesera industrial para el año de 2005 en Venezuela puede estimarse en unos 400 millones de kilos [4]; por lo que puede deducirse que el suero residual alcanza la cifra de 3.600 millones de litros.

La legislación venezolana vigente prohíbe la eliminación de suero en cursos de agua y estanques. También trae problemas encauzarlo en zanjas y lagunas construidas para tal fin pues el ácido láctico impermeabiliza el suelo, cuestión que impide la filtración, formándose así, espejos putrefactos que inciden negativamente en la conservación del ambiente [5].

La levadura *Kluyveromyces fragilis*, se utiliza ampliamente en el bioprocesamiento del lactosuero. Anteriormente conocida como *Sacharomyces cerevisiae* su nombre actual es *K. marxianus* var. *marxianus* [6]. Se encuentra en una gran variedad de frutas, es capaz de alterar la calidad de los quesos, el yogurt [7] y la leche [8], se ha aislado de lesiones humanas y animales [9], y además interviene en la fermentación natural de licores [10].

K. fragilis fermenta galactosa, sacarosa, rafinosa así como la lactosa, y asimila B-glucósidos, crece en un óptimo de temperatura de 20 -30 °C y un pH. entre 4,5 y 5,0. La presencia o ausencia de oxígeno en el medio determinará una oxidación completa (utilización aeróbica del sustrato) o una fermentación alcohólica (utilización anaerobia). De este hecho se deriva que en sistemas discontinuos para la producción de etanol se inician aeróbicamente para obtener la máxima biomasa, ya que si las condiciones anaeróbicas comienzan demasiado pronto la densidad de la población no será lo suficientemente alta para obtener una buena velocidad de conversión [11].

Se han reportado trabajos [12] con suero desproteinizado y *S. fragilis* observando, que la velocidad de fermentación alcohólica baja cuando el contenido inicial de lactosa es mayor del 5% y de etanol 10% v/v. Se ha logrado [13] producir vino con 12.2 % de alcohol a partir de permeados de lactosa, usando *K. fragilis* adaptada a altas concentraciones de lactosa [14]. Otros investigadores [15], emplearon *Candida pseudotropicalis* y dos especies de *Kluyveromyces*, reportando una completa conversión del

suero permeado de 15% de lactosa suplementando con urea y extracto de levaduras. Similarmente se demostró, [16] la conversión del 70% del proceso después de 48 horas cuando se usaron permeados de suero con 24% de lactosa. Rajagopalan y col [17] reportaron, la fermentación de suero en polvo reconstituido al 36% de sólidos totales, sometido a una ultrafiltración para separar la proteína; el permeado final contenía 24% de lactosa y dio un alto rendimiento de etanol, en el proceso se utilizó *K. fragilis* NRRLy al 10% v/v produciendo 108.8 g de etanol por litro, obteniéndose un rendimiento del 84%. En un trabajo posterior [18], se estudió el efecto de la concentración de lactosa sobre la fermentación alcohólica del suero con la levadura *C. pseudotropicalis* concluyendo, que a medida que aumenta la concentración de lactosa en el medio de fermentación hay un descenso progresivo en el rendimiento y un aumento en la duración del proceso, por efecto de la inhibición de la levadura. Viejo y col (1996) [19], estudió de influencia de la concentración inicial de lactosa sobre la fermentación alcohólica por *K. fragilis*., y concluyeron que concentraciones iniciales de sustrato por encima de 14% p/p, provoca inhibición de la levadura por altas concentraciones de etanol.

En procesos discontinuos el poder de inhibición aumenta a medida que aumenta la concentración del medio de fermentación, siendo mayor cuando se utilizan sustratos con lactosa que cuando contienen glucosa.

El etanol es inhibitorio a altas concentraciones y la tolerancia al alcohol de las levaduras es crítica para obtener altos rendimientos. La tolerancia al etanol de diferentes cepas varía considerablemente. A medida que aumenta la concentración de etanol la velocidad de crecimiento es reducida, mientras que a concentraciones más altas la propia biosíntesis de etanol es inhibida. Sin embargo, la levadura es más sensible al etanol producido endógenamente que al que se le añade exteriormente al sistema de fermentación [12].

Jansens y col (1984) [20] plantean el aprovechamiento del suero con base a una fermentación alcohólica. Existen otras posibilidades entre las que se encuentran la producción de proteína unicelular [21,22], de proteasas [21], de extracto de levadura [20,21], de β -galactosidasa [20,21,23] de glicerol [21], ácido acético [21], de levadura para la panificación [21] de ácido láctico [21,24,25]. El lactosuero resulta económico debido a su carácter de subproducto; es pues una buena elección como medio de cultivo para llevar a cabo procesos con microorganismos.

K. fragilis, una de las pocas levaduras que posee la capacidad de hidrolizar la lactosa por fermentación, el alcohol producido puede emplearse como alcohol industrial o para la formulación de bebidas alcohólica [26].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica llevada a cabo por *K. fragilis*. Se ha estudiado para ello las velocidades específicas de crecimiento de la levadura, consumo de azúcar (lactosa), producción de etanol y rendimientos globales del proceso fermentativo.

Materiales y Metodología Experimental

Microorganismo

El microorganismo utilizado en la presente investigación fue la *Kluyveromyces fragilis*, procedente de la colección Española de Cultivos Tipo, CECT, N° 1123, conservada por liofilización a 4°C procedente a su vez de un cultivo puro, activado en TYED (Triptona, extracto de levadura, D glucosa) y mantenida en solución de glicerol en congelación. La cepa guardada en glicerol se sembró en 10 ml. de medio líquido de TYED incubado a 30°C y con agitación a 200 rpm, por 24 horas sembrado por agotamiento y transferido en placas de petri con medio TYED sólido, incubado a 30°C., hasta observar crecimiento de colonias y conservadas en nevera por hasta 3 tres meses.

Preparación del inoculo

El cultivo de *Kuyveromyces fragilis* se repicó en un matraz pequeño, conteniendo 10 ml. de medio TYED, 24 horas más tarde se empleó como inóculo de 100 ml. de medio fresco.

Substrato: Lactosuero

Se empleó lactosuero en polvo denominado RENYLAT. 1300, suministrado por la empresa RENNY PICOT, Anleo, Asturias, reconstituido al 7, 10, 15, 20% p/p, (conteniendo 45, 64, 96 y 128 g/l de lactosa respectivamente), filtrado mediante flujo tangencial con dos membranas de polisulfona de tamaño de 0,3 um y posterior filtración con membrana de celulosa-Nitrato 0.45 um.

Pruebas de Fermentación

Se inocularon 100 ml. de lactosuero en erlenmeyers de 250 ml, en concentraciones de 7, 10, 15, 20 % p/p., al 10% v/v con un cultivo de *K. fragilis* en fase exponencial. Los erlenmeyers fueron colocados a 30°C con agitación a 200 rpm por 24 horas (aerobiosis), esto con la finalidad obtener la máxima biomasa, ya que si las condiciones anaeróbicas comienzan demasiado pronto la densidad de la población no será lo suficientemente alta para obtener una buena velocidad de conversión. Seguidamente se detuvo la agitación hasta terminar el proceso de fermentación por 34 horas.

Toma de Muestras

Dos alícuotas de 1 ml. cada una fueron tomadas en 9 ocasiones para medir variaciones de concentración celular, consumo de lactosa y producción de etanol en transcurso del proceso.

Concentración celular

Para la determinación de la biomasa se utilizó el método de peso seco [27].

Consumo de azúcares totales

Se utilizó el método de la antrona para la medición de los azúcares totales [28].

Producción de etanol

Se determinó por cromatografía de gases en columna capilar. Para ello se empleó un cromatógrafo marca Shimadzu, modelo GC.14B equipado con un detector de ionización de llama con autoinyector.

Velocidad específica de crecimiento

El crecimiento celular se expresa con frecuencia como proporcional a la cantidad de células presentes en ese instante. La constante (que solo lo es durante la fase exponencial) es lo que se denomina velocidad específica de crecimiento:

$$dX/dt = \mu X \quad (1)$$

Donde X es la concentración celular que expresamos, como peso seco, t es la variable temporal y es la velocidad específica de crecimiento (μ). Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento se representaron los datos en escala logarítmica; la zona recta corresponde a la fase exponencial y la pendiente es el valor de buscado. Durante la fase exponencial la concentración celular viene dada por:

$$X = X_0 \exp(\mu t) \quad (2)$$

Donde X_0 es la cantidad de células a tiempo cero [11].

Tiempo de duplicación del crecimiento celular

Para el cálculo de tiempo que requiere para que se duplique el cultivo (t_d), de la ecuación anterior:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (3)$$

La velocidad de duplicación (t_d) se aproxima al tiempo medio de vida celular, el periodo promedio para un ciclo celular completo [32,33].

Coefficientes de rendimiento, productividad y eficiencia

El rendimiento de substrato en biomasa (Y_x/s) se calculó dividiendo la biomasa presente al final del proceso entre el consumo de substrato.

$$Y_x/s = \text{g. peso seco de biomasa} / \text{g. lactosa} \quad (4)$$

Para el coeficiente de redimiendo en etanol (Y_p/s) se utilizó la siguiente relación: etanol producido en base consumo de substrato.

$$Y_p/s = \text{g. etanol} / \text{g. lactosa} \quad (5)$$

La productividad (P) de las fermentaciones se define como la relación entre la concentración de etanol por unidad de tiempo por volumen de fermentación.

$P = \text{Concentración de etanol/l.} / \text{Tiempo de fermentación}$ (6)

La eficiencia de transformación en una fermentación teóricamente es 0,51 g/l de etanol a partir de 1 gramo de lactosa. Este parámetro se calculó como la relación ente el

etanol obtenido y el teórico o esperado en la fermentación (11).

$$E = \frac{\text{etanol obtenido} \times 100}{\text{Etanol esperado o teórico}} \quad (7)$$

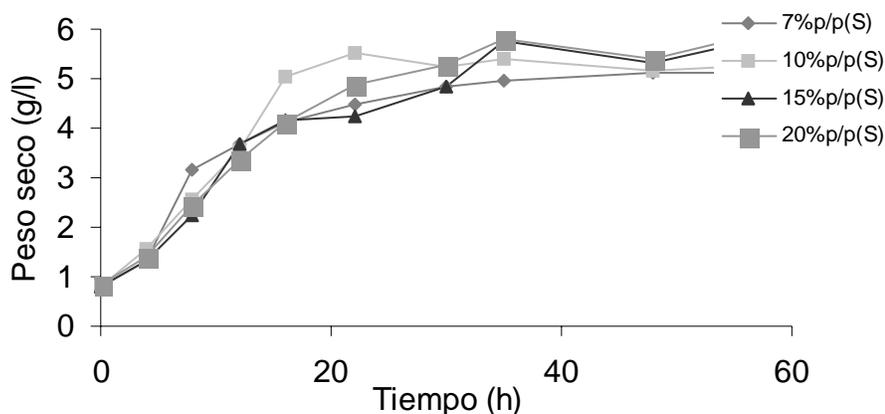


Figura 1. Efecto la concentración inicial del lactosuero sobre el crecimiento de *K. fragilis*. (Incubación a 30°C a 200rpm por 24 horas).

Resultados y Discusión

K. fragilis crecida en sustratos con diferentes concentraciones de lactosuero alcanzó la fase estacionaria entre las 26 y 30 horas de crecimiento con una concentración celular de aproximadamente (5 g/l) habiendo partido de un inoculo inicial de [(0,80 – 0,83) g./l.] (Figura 1). La velocidad específica de crecimiento celular (μ) a lo largo de la fase exponencial fue ligeramente mayor para el sustrato menos concentrado (7% sólidos) y se hizo menor conforme aumentó la concentración de sólidos, siendo esta velocidad menor para la fermentación con un porcentaje en sólidos del 20%. Los valores obtenidos para μ (0,17 – 0,10 h⁻¹) están de acuerdo a trabajos realizados por otros autores bajo las mismas condiciones experimentales. (26, 29). Se evidencia un aumento progresivo del tiempo de duplica-

ción celular (t_d) al aumentar la concentración inicial del lactosuero siendo mayor (6,77) para el sustrato concentrado al 20% (Tabla 1).

Tabla 1: Velocidad específica (μ) y tiempo de duplicación (T_d) durante la fase logarítmica de crecimiento de *K. fragilis* a diferentes concentraciones iniciales de lactosuero en el medio de cultivo.

[S] ₀ , %p/p	7	10	15	20
μ (h ⁻¹)	0.1717	0.1128	0.1075	0.1023
T_d (h)	4.04	6.14	6.45	6.77

Al finalizar la etapa de agitación se obtiene el máximo crecimiento celular (10%), para las otras tres concentraciones siguen aumentando la biomasa hasta por unas 10 horas más.

Tabla 2: Rendimientos globales correspondientes a las fermentaciones por *K. fragilis* de diferentes concentraciones iniciales de lactosuero

[S] ₀ , %p/p	7	10	15	20
Biomasa final (g/l)	5,11	5,3	5,83	5,96
Lactosa inicial (g/l)	45	64	96	128
Lactosa residual (g/l)	0,5	0,69	28,6	50,47
Consumo de lactosa (g/l)	44,5	63,31	67,4	77,53
[Etanol] máx.(g/l)	19,67	29,33	32,03	35,23
[Etanol] esperado o teórico.(g/l)	22,95	32,64	48,96	65,28
t (horas)	35,00	48,00	58,00	58,00
[Etanol] final (g/l)	18,9	29,13	32,03	35,23
Rendimiento de Etanol. Yp/s (g. etanol/g. lactosa)	0.42	0.46	0.47	0.45
Rendimiento de Biomasa Yx/s (g. peso seco/g. lactosa)	0,11	0,084	0,086	0,076
Productividad total de Etanol g/h.l	0,54	0,61	0,55	0,60
Eficiencia % (etanol final/etanol esperado ó teórico)	82,00	89,00	66,50	54,00

En la Tabla 1 y, 2, se observa que, según aumenta la concentración inicial del lactosuero, la velocidad específica de crecimiento disminuye y la concentración máxima de biomasa (fase estacionaria), aumenta.

El consumo de la lactosa es, inicialmente, mayor cuanto menor es la concentración inicial del lactosuero. En tan sólo 12 horas la *K. fragilis* consumió 23,41 g/l. (18,29 %) del lactosuero al 20%(p/p); 10,49 g/l. (10,89%) del lacto-

suelo al 15% (p/p); 32,4 g/l (51.%) del lactosuero al 10%(p/p) y 21,27 g/l (48%) del lactosuero al 7% (p/p). La concentración inicial más bajo (7%) el sustrato ha sido consumido a las 26 horas presentándose la mayor velocidad de crecimiento, el menor tiempo de duplicación y la menor producción de biomasa y etanol y menor eficiencia (Figura y Tabla 2).

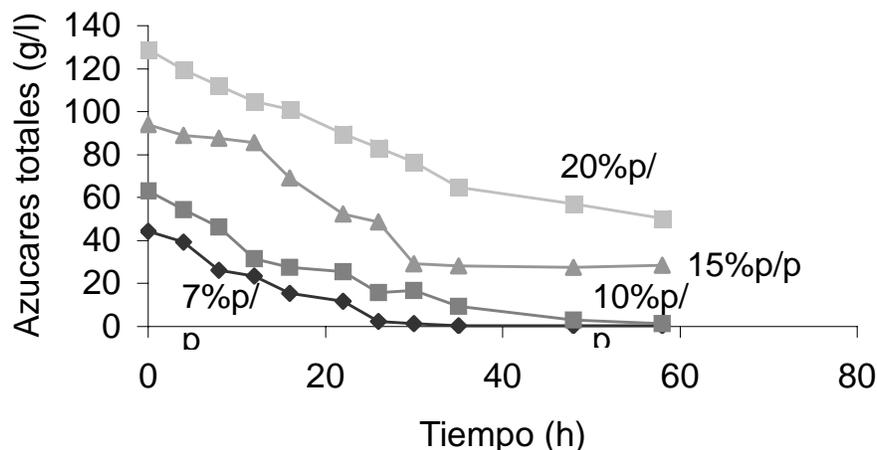


Figura 2.- Efecto de la concentración inicial de lactosuero sobre el consumo de azúcares totales en el proceso de fermentación alcohólica por *K. fragilis*.

La cantidad de lactosa sin consumir fue mayor en la medida que aumenta la concentración inicial del lactosuero. El consumo de lactosa fue de 99% para las concentraciones de lactosuero 7 y 10% (p/p) mientras que para las concentradas a 15 y 20% (p/p) queda un 30 y un 39 % de lactosuero sin consumir respectivamente (Tabla 2).

K. fragilis produjo más etanol cuanto mayor fueron las concentraciones de lactosa en el sustrato. La producción de etanol fue de 35,23 g/l, 32,03g/l, 29,33g/l y 18,9/l para las concentraciones 7%, 10%, 15% y 20% (p/p) respectivamente (Figura 3 y Tabla 2). Cuanto mayor es la

concentración de lactosa en el medio de fermentación mas tarde aparece la máxima concentración de etanol en el mismo. Cuando la concentración inicial de lactosa fue de 15%, (96 g/l lactosa) el incremento en la concentración de etanol en el producto no fue proporcional (31,03 g/l) como era de esperarse según los cálculos teóricos (49 g/l etanol). Concentraciones iniciales de sustrato por encima de 15% (p/p) no producen aumentos significativos en las concentraciones resultantes de etanol.

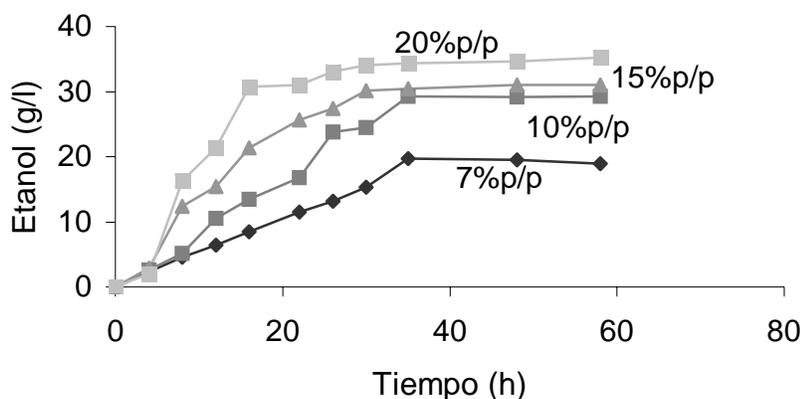


Figura 3. Efecto de la concentración inicial del lactosuero, sobre la producción de etanol durante la fermentación alcohólica por *K. fragilis*.

A concentraciones de $[S]_0 = 7$ y $[S]_0 = 10$ % el contenido de etanol llegó a alcanzar un valor estacionario, pero $[S]_0 = 15\%$ y $[S]_0 = 20\%$ (p/p), la levadura continuó produciendo etanol hasta el final del experimento (30 horas) como era de esperar, debido a la mayor concentración de azúcares en dichos substrato (Figura 3). *K. fragilis* sigue produciendo etanol hasta las 35 horas (después de alcanzar el estado estacionario) pero la cantidad de etanol producido no es significativa, posiblemente por efecto de inhibición de la levadura.

El coeficiente de rendimiento en función de producto, aumenta ligeramente a medida que aumenta la concentración de lactosa en el medio de fermentación y fue de 0,42 g/l, 0,46g/l, 0,47 y 0,45 g/l para las concentraciones 7%, 10%, 15% y 20% p/p respectivamente (Tabla 2). Sin embargo un aumento en la concentración inicial de substrato no refleja una productividad de etanol en el proceso de fermentación, siendo mas a menos la misma en todas las fermentaciones (Tabla 2). En la misma tabla se indican las máximas concentraciones alcanzadas en el proceso de fermentación, así como la eficiencia de la transformación. Se observa que un aumento en la concentración inicial del substrato reduce la eficiencia del proceso fermentativo, resultando 82%; 89%; 66% y 54% para los lactosueros en concentraciones de 7, 10, 15 y 20% p/p respectivamente.

Teniendo en cuenta que las concentraciones de células en el estado estacionario es la misma para todas las fermentaciones (5g/l) y, puesto que también lo fue la concentración celular de partida, (0,80 -0-83 g/l) además de que los contenidos de lactosa del medio fueron diferentes para cada una de las fermentaciones (45, 64, 96 y 128 g/l), se evidencia que concentraciones de etanol por encima de 30g/l se reduce la actividad de la levadura. Se deduce que ha tenido lugar una inhibición celular, debido a la concentración de etanol alcanzada en el medio de fermentación.

Los resultados demuestran que procesos de fermentación en concentraciones por encima de 10% p/p no refleja eficiencia en el proceso. Se recomienda que las fermentaciones sean llevadas a cabo a bajas concentraciones de azúcar menos de 15% (96 g/l de lactosa) para evitar que el proceso sea inhibido por el etanol. Por otro lado se sugiere la posibilidad de la utilización de técnicas de ingeniería de separación, que permita eliminar la inhibición por producto metabólico y mantener alta productividad de etanol.

Conclusiones

La concentración inicial de lactosuero (7, 10, 15, 20% p/p) no parece influir en el crecimiento de la *Kluyveromyces fragilis* durante el transcurso de la fermentación y es independiente de la concentración inicial del lactosuero. La velocidad específica de crecimiento celular (μ) a lo largo de la fase exponencial, fue ligeramente mayor para el substrato menos concentrado (7% sólidos) y se hizo menor conforme aumentó la concentración de sólidos y es inversamente proporcional al tiempo de duplicación celular. Al

finalizar la agitación (24 horas) se observa el máximo crecimiento celular en todos los experimentos.

El consumo de la lactosa fue, inicialmente, mayor cuanto menor fue la concentración inicial del lactosuero, pero la cantidad de lactosa sin consumir fue mayor en la medida que aumenta la concentración inicial de lactosa. Cuanto mayor es la concentración de lactosa en el medio de fermentación mas tarde aparece la máxima concentración de etanol en el mismo. Concentraciones iniciales de substrato por encima de 15% (p/p) no produce aumentos significativos en las concentraciones resultantes de etanol.

Teniendo en cuenta que la concentración celular en el estado estacionario fue la misma para las cuatro fermentaciones experimentales y, puesto que también lo fue la concentración celular inicial, además de que los contenidos en lactosa del medio fueron diferentes para cada una de las fermentaciones, se deduce que ha tenido lugar una inhibición del crecimiento celular, probablemente debido a la tolerancia limitada de la levadura a esa concentración de etanol alcanzada en el medio de fermentación.

El coeficiente de rendimiento en función de producto, aumenta ligeramente a medida que aumenta la concentración de lactosa en el medio de fermentación, sin embargo un aumento en la concentración inicial de substrato no refleja un aumento en la producción de etanol pero sí una reducción de eficiencia en el proceso fermentativo.

Para aumentar la producción y la eficiencia en procesos fermentativos bajo concentraciones de lactosa menos de 64 g/l, bajo estas condiciones experimentales, se recomienda el uso de técnicas de ingeniería de separación, que permita eliminar la inhibición por productos metabólicos.

Para un proceso de fermentación alcohólica eficiente con lactosuero y *Kluyveromyces fragilis*, se recomienda bajas concentraciones de lactosa, menores a 15% (96 g/l de lactosa), para evitar que el proceso sea inhibido por etanol, y de esta manera, dar valor añadido a un subproducto considerado el desecho más contaminantes de la industria alimentaria.

Referencias

- [1] Tetra Pak Processing Systems AB. 2003. Manual de industrias lácteas. Cap. 15 Editorial AMV.
- [2] Verónica Engler, 2003. Centro de Divulgación Científica - SEGBE - FCEyN http://www.fcen.uba.ar/prensa/noticias/2003/noticias_12ago_2003.html.
- [3] http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/QUESO/queso.htm.
- [4] <http://www.mat.gov.ve/>.
- [5] Caminotti, S.; Spiner, N. 1993. Plan de mejoramiento de la producción porcina. ISSN 0327 - 6732. Hoja informativa N° 243, EEA, INTA Marcos Juárez. Argentina.
- [6] America Type Culture Collection (ATC). 1991. Catalogue of yeast. 18 th edition. 230.
- [7] Mackay, A. 1992. Growth of fermentative and nonfermentative yeast in natural yoghurt, stored in poliestirene cartons. Int. J. Food Microbiol. 15(3-4): 383-8.
- [8] Roostita, R.; Fleet, G. 1996. Growth of yeast in milk and associated changes to milk composition. Int. J Food Microbiol. 31 (1-3): 205-19.

- [9] Da Silva, C; Porto, E y otros. 1998. Guia para Identificación. Fungos Actinomicetos, Algas de Interés Médico. Sarvier. Fapesp. Editorial Afiliada. Sao Pablo, Brasil.
- [10] Lachance, M. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68 (2): 151-60.
- [11] Crueger, W. y Crueger A. 1993. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- [12] Yang, H. Y., Bodyfelt, F. W., Berggren, K.E., Larson, P.K. 1975. Proc., 6th Nat. Symp. Food Process Wastes, U.S. Environmental Protection Agency. WASHINGTON, D.C. 180.
- [13] Kosikowski, F.V., Wzorek, W.J. 1977. *Dairy Sci.* 60:1982.
- [14] Gawel, J., Kosikowski, F. V. J. 1978. *Food Sci.* 43, 1417.
- [15] Burgess, K.J., y Kelly, J. 1979. *Irsh. J. Food Sci. Technol.*, 3, 1-9.
- [16] Moulin, G., Boze, H y Galzy, P. 1981. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 351-6.
- [17] Rajagopalan, K. and Kosikowski, F.V. 1982. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 21, 82-7.
- [18] Cuesta, M. 1988. Efecto de la concentración de lactosa sobre la fermentación alcohólica del suero por *Candida pseudotropicalis*. Tesis de Doctorado en Química. Universidad de Oviedo. España.
- [19] Viejo, A. 1996. Producción de una bebida alcohólica a partir de lactosuero. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Química. Universidad de Oviedo. España.
- [20] Jansens, J.K., Bernard, A. and Bailey, R.B. 1984. Ethanol from Whey: Continuous Fermentation with Cell Recycle. *Biotechnol. and Bioeng.*, 26, 1-5.
- [21] Yang, S.T. and Silva, E.M. 1995. Novel Products and New technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *J. Dairy Sci.*, 78,2541-62.
- [22] Quintero, H.; Rodriguez, M.; Paéz, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z.; y Rincón, M.; 2001. Producción continua de proteína Microbiana (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. *Acta Científica Venezolana*. 2: 87-94.
- [23] Montiel, X. 2000. Producción de B-D galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga con lactosuero como sustrato. *Rev. Tec. Ing. Uni.* 23 (2): 134-140.
- [24] Jakymec, M.; Moran, H.; Páez, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z.; Ramones, E. "Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato". *Rev. Cient., FCV-LUZ*. XI(1): 53-59. 2001.
- [25] Lauris Urribarrí.; Alex Vielma.; Gisela Paé.; José Ferre.; Zulay Mármol.; y Eduardo Ramones. Producción y Acido láctico a partir de Suero de Leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, N° 4, 297-302_2004*.
- [26] Parrondo, J.; García, L.A. y Díaz, J. M. 2000. "Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *kluyveromyces fragilis* I: Primary metabolism", *J.Inst. Brewing*, 106,6, 367-76.
- [27] Rhodes, P. M and Stanbury, P.F 1997. *Applied Microbial Physiology.*, Ed Oxford University Press, Oxford.
- [28] A.O.A.C. 1990. *Official Methods methods of Analysis*. 15th edition. Asociation of Official Analytical Chemists. Artington, Virginia.
- [29] Walter, G.M and O'J.D. 1990. Morphological and Metabolic Changes in the Yeast *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* NRRLy2415 durin Fermentación of lactose. *J. Chen. Biotechnol.*, 49, 75-89.