

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA
BASTIDAS DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**PRODUCCIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA
FERMENTADA A PARTIR DE LACTOSUERO
UTILIZANDO CEPA AISLADA DE LEVADURA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

ANDERSON NUÑEZ FERNANDEZ

Abancay, diciembre de 2010

PERÚ



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN
T IAG N 2010	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	28 MAR 2012
Nº DE INGRESO:	00231



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL

Jurado calificador integrado por:



Mg. Fulgencio Vilcanqui Pérez
Presidente

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC




Ing. M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca
DOCENTE

M. Sc. Víctor H. Sarmiento Casavilca
Jurado



Ing. Juan Silver Barreto Carbajal
Accesitario



Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres
Asesor





**PRODUCCIÓN DE UNA BEBIDA
ALCOHÓLICA FERMENTADA A PARTIR DE
LACTOSUERO UTILIZANDO CEPA AISLADA
DE LEVADURA**



DEDICATORIA

Para el creador de todas las cosas, gracias a él yo vivo y gozo de buena salud, que me dio la oportunidad de estar aquí y poder disfrutar de lo hermoso que es la vida.

A mis padres Guillermo Núñez Hurtado y Eulogia Fernández Córdova por haber creído en mí desde el principio y haberme prestado su apoyo incondicional en todo momento.



AGRADECIMIENTO

Expreso un cordial agradecimiento a mi coasesor Dr. Prof. Waldir Desiderio Estela Escalante, quien en todo momento me brindó su asesoría y consejos sabios que sirvió para culminar este trabajo de investigación. Enormemente contento de haber compartido su amplia experiencia en el mundo de la investigación.

Del mismo modo a mi asesor Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres por los consejos brindados para el cumplimiento del presente trabajo y apoyo en los diversos trámites documentarios para el desarrollo del mismo.

A mis hermanos Herbert, Robert, Yeni, Yuver y Rony Núñez Fernández que representan una parte muy especial en mi vida gracias por haberme brindado su comprensión y apoyo incondicional.

A Yasmine Rosas Damián quien estuvo cuando más lo necesité sobre todo en los momentos difíciles de mi vida por ello forma parte de mí, es muy importante resaltar a una mujer que es amiga y sobre todo mi gran confidente mamita Justina Damián Arias mencionar reiteradas veces muchas gracias por sus consejos y sabias recomendaciones que es como una madre para mí, del mismo modo agradecer a Verónica y Jordi Olivarez Damián por estar conmigo cuando más los necesite y hacerme dar lo mejor de mí, los quiero mucho.



A mis compañeros de laboratorio Lucio, Jorge, Joseantonio, José Humberto y Jinmer, con quienes formamos un grupo especial de trabajo y amistad que permanecerá por siempre. Como olvidar los dos años y medio en el laboratorio que sirvió para entender e iniciar esta tarea difícil de la investigación.

A todos los profesores y personal responsable de los laboratorios de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por ayudarme en todo lo que he necesitado durante el periodo de desarrollo de esta tesis y por llenar mis días de inolvidables momentos. Gracias al Ing. Zulema Ludeña Cervantes, Ing. Justo F. Arias Motta, al responsable del laboratorio de Microbiología, al encargado de la biblioteca por facilitarme con la bibliografía requerida para que esta investigación se concluya y todas aquellas personas que estuvieron conmigo en los momentos difíciles de mi vida.

A mis jurados evaluadores, Msc. Fulgencio Vilcanqui Pérez, Msc. Victor Hugo Sarmiento Casavilca, Ing. David Fernando Palomino Quispe y al Ing. Juan Silver Barreto Carbajal, por sus observaciones que me ayudaron a perfeccionar este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac por acogerme como un segundo hogar, gracias porque en ella desarrollé mi formación y experiencia.

Muchas gracias.



ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Generalidades del suero de quesería	7
2.2. Tipos de suero	8
2.3. Composición y naturaleza del suero	11
2.4. Características físico – químicas del lactosuero	12
2.4.1. Carbohidratos del lactosuero	13
2.4.2. Vitaminas del lactosuero	17
2.5. Aplicación y productos actuales del lactosuero	17
2.6. Utilización del suero lácteo como medio de cultivo	20
2.7. La fermentación del lactosuero	21
2.8. Problemas derivados de la producción del suero lácteo	23
2.9. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica	27
2.9.1. <i>Kluyveromyces fragilis</i>	28
2.9.1.1. Características asimilativas de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	30



2.9.1.2. Características fermentativas de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	31
2.9.2. <i>Kluyveromyces lactis</i>	32
2.10. Generalidades de biorreactores	33
2.11. Biorreactores utilizados en la fermentación	34
2.11.1. Biorreactores con sistema de fermentación homogéneos	34
2.11.2. Biorreactores con sistema de fermentación heterogéneos	34
2.12. Producción de una bebida fermentada de lactosuero	35
2.13. Bebida alcohólica de suero	37
2.14. Análisis sensorial y fisicoquímico de la bebida	39
2.14.1. Análisis sensorial	39
2.14.2. Análisis fisicoquímico	41
II. PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1. Aislamiento e identificación de levaduras	43
3.1.1. Aislamiento de levaduras	44
3.1.2. Mantenimiento de cepas aisladas	45
3.1.3. Identificación de cepas de levadura aisladas	45
3.1.3.1. Estudio morfológico de cepas aisladas	46
3.1.3.2. Estudio fisiológico de cepas aisladas	46
3.2. Preparación del lactosuero	48
3.2.1. Obtención y acondicionamiento del lactosuero	48
3.2.2. Caracterización fisicoquímica del suero desproteinizado	49
3.3. Preparación de inóculo	50
3.4. Fermentación del lactosuero	50



3.5. Evaluación de calidad de la bebida fermentada	52
3.5.1. Evaluación fisicoquímica	52
3.5.2. Evaluación sensorial	53
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1. Aislamiento e identificación de levaduras	55
4.2. Identificación de cepas de levadura aisladas	56
4.2.1. Estudio morfológico de levaduras	56
4.2.2. Estudio fisiológico de levaduras	57
4.3. Elaboración de la bebida fermentada de lactosuero	68
4.4. Preparación del suero para la fermentación	69
4.4.1. Análisis de composición físico-química de la bebida de lactosuero	72
4.4.2. Análisis de composición nutricional de la bebida de lactosuero	76
4.4.3. Análisis sensorial de la bebida de lactosuero	81
4.4.3.1. Sabor y aroma de la bebida de lactosuero	81
4.4.3.2. Color de la bebida fermentada	91
4.4.3.3. Aceptabilidad de la bebida	93
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	95
5.1. Conclusiones	95
5.2. Recomendaciones	97
Bibliografía	98
Apéndice	108



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01: Clasificación de los sueros derivados de la producción de queso según su acidez	9
Tabla 02: Composición de algunos sueros fluidos y en polvo comerciales	11
Tabla 03: Composición media de los lactosueros	12
Tabla 04: Poder edulcorantes relativos de diferentes azúcares	16
Tabla 05: Asimilación de compuestos de carbono por <i>Kluyveromyces fragilis</i>	30
Tabla 06: Fermentación de azúcares por <i>Kluyveromyces fragilis</i>	31
Tabla 07: Patrón de asimilación de <i>Kluyveromyces fragilis</i> , comparadas con otras especies de levaduras crecidas comercialmente	31
Tabla 08: Productos formados por la fermentación de 170g de azúcar	37
Tabla 09: Composición química para 100 ml de solución Rauling	45
Tabla 10: Evaluación de la capacidad fermentativa de fuentes de carbono por levaduras aisladas	58
Tabla 11: Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por Kc BA-IA-2009-I	59
Tabla 12: Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por Kc BA-IA-2009-II	61
Tabla 13: Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de la cepa Kc BA-IA-2009-I	63
Tabla 14: Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de la cepa Kc BA-IA-2009-II	64
Tabla 15: Producción de etanol, acidez y pH por las cepas Kc BA-IA-2009-I y Kc BA-IA-2009-II, durante la fermentación del mosto de lactosuero	65
Tabla 16: Promedio de puntuaciones obtenidas durante la evaluación sensorial	82



de sabor y aroma en la bebida fermentada de lactosuero

Tabla 17: Grado de significancia entre tratamientos	85
Tabla 18: Grado de significancia de los tratamientos con respecto al atributo suero	86
Tabla 19: Grado de significancia entre tratamientos con respecto al atributo acidez	90
Tabla 20: Promedio de los valores de percepción del color de la bebida fermentada de lactosuero	92
Tabla 21: Grado de significancia entre tratamientos con respecto al atributo color	93



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Diagrama de flujo para la elaboración de una bebida fermentada a partir de lactosuero	51
Figura 02: Morfología de las colonias de levaduras aisladas sobre agar Saboraud	57
Figura 03: Transcurso de la fermentación con la cepa Kc BA-IA-2009-I en mosto de suero a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$	66
Figura 04: Transcurso de la fermentación con la cepa Kc BA-IA-2009-II en mosto de suero a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$	67
Figura 05: Biorreactor utilizado durante la fermentación del lactosuero	71
Figura 06: Progreso de la producción de etanol durante la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero	72
Figura 07: Progreso de la variación del pH y acidez durante la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero	74
Figura 08: Proceso de la variación de la densidad durante la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero	76
Figura 09: Contenido de proteína del suero desproteínizado y la bebida fermentada	77
Figura 10: Diagrama de Pareto estandarizado para la proteína	79
Figura 11: Contenido de lactosa del suero desproteínizado y la bebida fermentada	80
Figura 12: Diagrama de Pareto estandarizado para la lactosa	80
Figura 13: Grado de concentración del amargor en la bebida	82
Figura 14: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo amargo	83
Figura 15: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo metálico	83



Figura 16: Grado de percepción alcohólico en la bebida	84
Figura 17: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo alcohólico	84
Figura 18: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo suero	85
Figura 19: Grado de concentración de la levadura en la bebida	87
Figura 20: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo levadura	87
Figura 21: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo diacetilo	88
Figura 22: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo acetaldehído	88
Figura 23: percepción de la acidez en la bebida	89
Figura 24: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo acidez	89
Figura 25: Atributos sensoriales evaluados en la bebida de lactosuero	91
Figura 26: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo color	92
Figura 27: Aceptabilidad por los clientes de las diversas muestras de la bebida fermentada a partir de lactosuero	94



RESUMEN

El suero es el subproducto de desecho más importante de la industria quesera en el país. Según Inda (2000), al desperdiciar el suero se pierde cerca de 95% de la lactosa, y más del 50% (en peso) de los nutrientes de la leche. Al ser este un producto altamente nutritivo también se convierte en un desecho altamente contaminante, por ello se considera que es un problema muy importante en la industria quesera, con un alto impacto económico y ecológico. Por lo que el objetivo de esta investigación fue desarrollar una bebida fermentada de lactosuero utilizando sepa aislada de levadura.

En esta investigación se realizó el aislamiento de dos cepas nativas de levaduras *Kluyveromyces sp.* (Cepa Kc BA-IA-2009-I y Cepa Kc BA-IA-2009-II), del mismo modo se realizó estudio sobre las características tecnológicas de cada cepa como estudio previo. De las cuales se eligió la cepa Kc BA-IA-2009-II por tolerar mayores concentraciones de etanol y requerir menores concentraciones de oxígeno para la fermentación.

Como estudio central se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de inóculo y los niveles de aireación, se realizó un diseño factorial de 2^2 , donde los factores que se consideraron fueron; concentración de inóculo con dos niveles (2%v/v y 5% v/v) y velocidad de aireación con dos niveles (0L. aire/minuto y 0.8L. aire/minuto), cada nivel se realizó por triplicado para garantizar los resultados obtenidos. Los demás parámetros como temperatura de fermentación y tiempo de fermentación se mantuvieron constantes para los cuatro tratamientos. La bebida elaborada fueron sometidos a unos análisis fisicoquímicos tales como porcentaje de etanol, acidez, pH y densidad; valores nutricionales como: porcentaje de proteína y lactosa, fue necesario



densidad; valores nutricionales como: porcentaje de proteína y lactosa, fue necesario evaluar las características sensoriales con jueces que evaluaron la aceptación de la bebida en función de su sabor, aroma y apariencia general. La bebida seleccionada por el panel fue caracterizada químicamente mediante un análisis proximal. Los análisis estadísticos demuestran que la concentración de aireación no tiene influencia significativa sobre los valores fisicoquímicos, pero si influye en el análisis sensorial. De la misma forma los análisis estadísticos demostraron que el porcentaje de inóculo tiene influencia significativa sobre los valores fisicoquímicos, valores nutricionales y análisis sensorial de la bebida fermentada de lactosuero.

La bebida elaborado con el tratamiento de 5% de inóculo y 0L/min, alcanzaron valores de 43.75% de aceptación.

PALABRAS CLAVE: suero, aislamiento, inóculo, aireación, fermentación.

ABSTRACT

Whey is the most important waste product of cheese industry in the country. According to Inda (2000), the serum is lost to waste about 95% of lactose, and more than 50% (by weight) of nutrients of milk. Since this is a highly nutritious product also becomes a highly polluting waste, therefore it is considered a major problem in the cheese industry with high economic and ecological impact. So the objective of this research was to develop fermented whey isolated using yeast known. In this investigation the isolation of two native strains of yeast *Kluyveromyces* sp. (Strain Kc BA-IA-2009-I and Kh strain BA-IA-2009-II), just as was done study on the technological characteristics of each strain as the previous study. Of which was chosen Kc strain BA-IA-2009-II to tolerate higher concentrations of ethanol and lower concentrations of oxygen required for fermentation. As a central study evaluated the effect of different concentrations of inoculums and aeration levels, we performed a 2² factorial design, where the factors considered were: inoculums concentration with two levels (2% v / v 5% v / v) and rate of ventilation with two levels (0L. air / min and 0.8L. air / min), each level was performed in triplicate to ensure the results. Other parameters such as fermentation temperature and fermentation time remained constant for the four treatments. The drink prepared were subjected to physicochemical analysis such as a percentage of ethanol, acidity, pH and density, nutritional value as percentage of protein and lactose, was necessary to evaluate the sensory characteristics with semi-trained panelists who assessed the acceptance of drinking as a function of taste, aroma and overall appearance. The beverage selected by the panel was characterized chemically by proximate analysis.



Statistical analysis showed that the concentration of aeration does not have significant influence on the physicochemical values, but it affects the sensory analysis. Similarly, statistical analysis showed that the percentage of inoculums has a significant influence on the physicochemical, nutritional values and sensory analysis of drinking fermented whey.

The drink made with the treatment of 5% inoculums and 0L/min, reached values of 43.75% acceptance.

KEY WORDS: serum, isolation, inoculums, aeration, fermentation.

I. INTRODUCCIÓN

El suero es un subproducto de la industria lechera que se obtiene mediante la precipitación y remoción de la caseína de la leche durante la elaboración del queso fresco y su composición varía de acuerdo al origen de la leche. Este subproducto representa de un 85% a un 90% del volumen de la leche y retiene 55% de los nutrientes de ella. Los nutrientes que presentan en su mayoría está compuesta por lactosa, lípidos, proteínas solubles y minerales (Siso, 1996).

El problema con el suero es que en la actualidad, la mayor parte de este es desechado por los productores de queso en fuentes de agua, constituye una amenaza para la vida en dichas fuentes. El alto contenido de sólidos orgánicos en el suero produce una demanda bioquímica de oxígeno (D.B.O) de 40000mg/L a 50000mg/L, un D.B.O. de esta magnitud haría que un litro de suero fuera suficiente para matar a todos los peces que ocupan en 10 toneladas de agua (Susuki, 1972), citado por (Ortiz y Noventa, 1998).

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo producir una bebida alcohólica fermentada a partir de lactosuero utilizando cepa aislada de levadura. Para tal fin se debe desdoblar la lactosa (azúcar de la leche) en dos monosacáridos que la componen, glucosa y galactosa, evitando problemas con la digestibilidad de la bebida, ya que un porcentaje de la población son intolerantes a la lactosa. Los azúcares mientras más sencillos sean aumenta la dulzura y el sabor de la bebida, (Ranken, 1988).

El lactosuero se ha utilizado para la producción de una bebida fermentada alcanzando valores finales de 3.25% de etanol en promedio, y que ha tenido una calificación de me gusta mucho con un valor de 43.75% de aceptación.

Los objetivos de la investigación fueron los siguientes:

- Producir una bebida alcohólica fermentada a partir de lactosuero, mediante un proceso de fermentación con levadura aislada.
- Realizar el proceso de aislamiento como etapa preliminar al proceso fermentativo de la bebida de lactosuero.
- Evaluar la influencia de la concentración del inóculo en relación a la aireación durante la fermentación en las definiciones de las características sensoriales de la bebida fermentada.
- Evaluar la influencia de la aireación en relación a la concentración de inóculo durante la fermentación en las definiciones de las características fisicoquímicas de la bebida fermentada.



II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del suero de quesería

El suero es el líquido que se obtiene al coagular la leche para la elaboración de quesos, la cual se da por la separación de la mayor parte de la caseína y la grasa. La composición que tenga este suero dependerá de la leche utilizada y el tipo de queso a elaborar, además del sistema de coagulación que se utilice. Por ejemplo, al elaborar un queso utilizando una leche fresca (pH 6,6) y cuyo proceso no requiera una acidificación como en el caso del queso fresco, se obtiene un suero dulce. Por el contrario, al elaborar un queso cuyo proceso requiere una acidificación como en el queso Mozzarella, o se trabaja con una leche que ha sido acidificada con anterioridad, se obtiene un suero ácido (Madrid, 1986).

El suero lácteo es la fase acuosa de la leche, obtenida por medio de acidificación, aplicación de calor o coagulación enzimática. Su apariencia es opaca y de coloración verde-amarilla (Badui, 1977; Early, 2004; Keating, 2002 y Kosikowski, 1982). Representa el 80-90 % del volumen total de la leche que entra en el procesamiento del queso, y contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche original (Varnam y Sutherland, 1994).

Un lactosuero debe ser considerado como un producto derivado más que como un subproducto de la fabricación de los quesos, o de la caseína. Se distinguen dos tipos de lactosuero, uno el que resulta de la coagulación de la leche no ácida por acción del

cuajo, se denomina lactosuero dulce y el otro que resulta, de la fabricación de los quesos de la pasta frescas o de pastas blandas, que es el resultado de la fabricación de la caseína láctica o ácida y que se denomina lactosuero ácido (Linden y Lorient, 1996).

La mayor parte de agua contenida en la leche se concentra en el lactosuero y en ella se encuentran todas las sustancias solubles, como la lactosa, las proteínas solubles, las sales minerales solubles y algo de grasa. (Sottiz, 1993).

En resumen, dependiendo del proceso de coagulación se pueden obtener dos tipos de suero: un suero dulce que posee un pH entre 6.0 - 6.6 y con un bajo contenido de calcio; y suero ácido el cual posee un pH entre 4.3 - 4.7 (Madrid, 1996).

2.2 Tipos de suero

La producción mundial de queso se ha incrementado en los últimos años, y con ello la del suero. Por ello, es importante clasificar el mismo para un mejor aprovechamiento (Kosikowski, 1982).

Dependiendo del origen de la leche, el tipo de queso, y las variaciones del proceso, el tipo de suero será diferente. Una de las clasificaciones está en función de su acidez:

Tabla 01: Clasificación de los sueros derivados de la producción de queso según su acidez

Tipo de suero	Acidez titulable	pH
Suero dulce	0.10 a 0.20%	5.9 a 6.6
Suero medianamente ácido	0.20 a 0.40%	5.1 a 5.8
Suero ácido	0.40 a 0.60 %	4.0 a 5.0

Fuente: Kosikowski (1982).

El suero ácido proveniente de la precipitación de la caseína por la acción de ácidos débiles en elaboración de queso blanco es aún menos utilizado que el suero dulce. El queso blanco elaborado con ácido acético posee una textura diferente al queso elaborado con renina. Entre los grandes factores que limitan el uso del suero ácido se encuentra su alto contenido de ceniza y su acidez (pH 4.3 - 4.6), debido a esto produce problemas funcionales y problemas de sabor (Gruetzmacher y Bradley, 1991). Solo un pequeño % es utilizado para alimento de seres humanos, el resto se utiliza para alimento de animales, o se esparce en la tierra como fertilizante (Gruetzmacher y Bradley, 1991). Hay que tener en cuenta que para que el suero pueda ser esparcido como fertilizante en la tierra tiene que primero pasar por un tratamiento que es altamente costoso para las industrias lecheras (Gruetzmacher y Bradley, 1991).

Los sueros ácidos y dulce pueden ser condensados, secados, fermentados, delactosados, desmineralizados, desproteinados. Utilizando tecnologías como la ultrafiltración, ósmosis inversa, intercambio de iones y electro diálisis. Además, la preparación de formulaciones para niños recién nacidos, ha sido un negocio rentable a nivel mundial (Kosikowski, 1982 y Wisconsin, 2002).



Al igual que el suero ácido, el suero dulce posee un alto contenido de ceniza y es un subproducto de la industria de queso, pero es menos ácido (pH 5.9 – 6.6) y es producido por la coagulación de la leche con renina. Sin embargo, a diferencia del suero ácido puede ser utilizado por sus numerosas propiedades funcionales como dar color, brindar tamaño y producir espuma. También posee una mezcla compleja de lactosa, proteínas, minerales, con pequeñas cantidades de humedad y grasa. Por estas razones la industria de alimento ha reconocido que el suero dulce es un buen ingrediente en la incorporación a un alimento. Al igual que el suero ácido, el suero dulce también es utilizado como un componente importante en los alimentos de animales. Actualmente el suero dulce es más utilizado por las industrias lecheras que el suero ácido por sus numerosas propiedades funcionales (Banavara et al., 2003).

Este producto constituye por tanto, una nueva oportunidad de desarrollo de productos alimenticios. Para otros, significa un producto de desecho, sin un futuro inmediato, pero sí con un potencial a largo plazo (Kosikowski, 1982 y Wisconsin, 2002).

El suero ácido tiene un alto contenido de calcio, debido a que el ácido láctico reacciona con el calcio presente en la red de paracaseinato, y lo disuelve como lactato de calcio. El suero dulce, obtenido por coagulación con cuajo, apenas contiene calcio, ya que produce un desdoblamiento del complejo Caseína- calcio en paracaseinato cálcico y proteína sérica (Early, 2004; Keating, 2002 y Alcázar, 1992).



2.3 Composición y naturaleza del suero

La composición, tanto del suero y como de sus subproductos, es dependiente de las condiciones de producción del queso. En la tabla 02, se puede observar una composición generalizada de estos productos.

Tabla 02: Composición de algunos sueros fluidos y en polvo comerciales

Componentes	Suero dulce	Suero ácido	Suero ácido concentrado	Suero dulce en polvo	Suero ácido en polvo
Sólidos totales	6.35%	6.50%	64.00%	96.50%	96.00%
Humedad	93.70%	93.50%	33.50%	3.50%	4.00%
Grasa	0.50%	0.04%	0.60%	0.80%	0.60%
Proteína Total	0.80%	0.75%	7.60%	13.10%	12.50%
Lactosa	4.85%	4.90%	34.90%	75.00%	67.40%
Cenizas	0.50%	0.80%	8.20%	7.30%	11.80%
Ácido Láctico	0.05%	0.40%	12.00%	0.20%	4.20%

Fuente: Kosikowski (1982).

La composición química del suero lácteo es variable, dependiendo de: los tratamientos a los que se someta la leche (calentamiento, centrifugación, homogeneización, etc.) las características intrínsecas del procesamiento de los diferentes tipos de derivados lácteos (tipo de cultivos utilizados, manipulación mecánica, procesos de membrana, etc.). Aunque el suero tiene alrededor del 93% de agua, su composición típica indica la presencia de varios elementos valiosos (Ocampo et al., 2000 y Kosikowski, 1982).

Estos componentes del suero quedan después de la producción de diversos productos lácteos y constituyen un problema ecológico en el mundo entero (Ocampo et al., 2000 y Kosikowski, 1982).



La composición media de lactosuero mostrado en la tabla 03. Puede variar, depende en gran medida del origen de la leche, la alimentación del mamífero, el cuidado entre otros factores que son importantes.

La presencia de constituyentes con valor nutritivo elevado y con aptitudes funcionales interesantes así como de moléculas con alto valor añadido (lactoferrina, lactoperoxidasa) son los argumentos que abogan a favor de la valorización de este coproducto de la industria láctea. (Linden y Lorient, 1996).

Tabla 03: Composición media de los lactosueros

Componentes	Leche	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Agua (%)	97.6	93	93.5
Materia seca (E.S.) (%)	12.4	7	6.5
Materia grasa (%)	3.4	0.4	0.1
Caseína (%)	2.6	Tr.	Tr.
Proteínas solubles (%)	0.7	0.9	0.7
Lactosa (%)	4.7	5.0	4.5
Sales (cenizas) (%)	0.9	0.6	0.7
Ácido láctico (%)	-	0.1	0.6

Fuente: Linden y Lorient (1996).

2.4. Características físico - químicas del lactosuero

El suero derivado de la producción del queso es muy nutritivo, y retiene aproximadamente el 52% de los nutrientes de la leche entera. A pesar de su excelente contenido nutricional, la manipulación del suero de desecho de la producción de queso, es un problema caro y complicado, para el productor. Posee un porcentaje de



sólidos de 6.0 % a 6.5 %, y una demanda bioquímica de oxígeno superior a 32000 mg de oxígeno/L. de lactosuero (Kosikowski, 1982 y Badui, 1977).

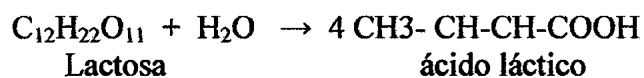
Las proteínas y la lactosa se transforman en contaminantes cuando el líquido es arrojado al medioambiente sin ningún tipo de tratamiento, porque la carga de materia orgánica que contiene permite la reproducción de microorganismos (Kosikowski, 1982 y Badui, 1977).

2.4.1. Carbohidratos del lactosuero

La lactosa es el componente mayoritario de la materia seca de la leche. Otros azúcares también están presentes, pero en cantidades vestigiales. Se trata generalmente de poliósidos (Spreer, 1991). El contenido de lactosa en el suero, es de 4.5% m/v – 5.0% m/v (Alcázar, 1992). En el proceso de fabricación de los quesos, un 95% de la lactosa se pierde en el lactosuero (Furtado, 1999).

La lactosa es un glucócido reductor que pertenece al grupo de los diholósidos, que está formada por la unión de una molécula de α o β -glucosa y otra β -galactosa (Early, 2004; Keating, 2002 y Spreer, 1991).

La evolución más frecuente, y a la vez, más importante, en su transformación en ácido láctico, llevada a cabo por las bacterias lácticas (Spreer, 1991).



Según el tipo de microorganismos presentes, la lactosa sufrirá fermentaciones, que producirán diferentes productos secundarios (Early, 2004; Keating, 2002 y Spreer, 1991).

La lactosa residual en los productos lácteos, pueden provocar problemas a la digestión de los consumidores intolerantes a la lactosa, debido a la ausencia de la enzima lactasa (NDDIC, 2005). Algunos productos lácteos fermentados, tienen la capacidad de disminuir estos problemas de mal absorción, por su habilidad de catabolizar la lactosa. En algunos productos lácteos fermentados como el yogur, las bacterias lácticas metabolizan más del 50% de la lactosa presente en la leche (Marshall y Tamine, 1992).

Las bacterias *Streptococcus salivarius var thermophilus* y *Lactobacillus helveticus*, tienen capacidad de metabolizar la lactosa. Además, *S. thermophilus* puede fermentar la sacarosa y el *Lactobacillus helveticus*, puede metabolizar galactosa por la vía de Leloir (Marshall y Tamine, 1997).

Para separar de los demás componentes, con el fin de purificarla, se puede operar siguiendo dos métodos, bien eliminando uno a uno los demás constituyentes, las proteínas y las grasas por ultrafiltración, las sales minerales por intercambio iónico y electrodiálisis el agua por concentración y secado espray, con lo que se obtiene entonces lactosa espray; o bien utilizando una de las propiedades de la lactosa, su baja

solubilidad, concentrando el lactosuero y haciendo que cristalice este azúcar (Sottiez, 1993).

La lactosa presenta un interés dietético fundamental, puesto que es la única fuente de hidrato de carbono de los mamíferos jóvenes, incluido el hombre, y constituye la base de todos los productos destinados a reemplazar la leche materna (Sottiez, 1993).

Los intereses fundamentales (Sottiez, 1993) son:

- Como todos los azúcares constituye 4Kcal por gramo y contribuye a estabilizar el pH intestinal, dando lugar a una mejor utilización digestiva del calcio y del fósforo.
- La disminución del pH evita la instalación de flora purificante.
- La lactosa es un disacárido, compuesto por un molécula de glucosa y otra de galactosa, esta última constituyente esencial de los cerebrósidos, componentes del tejido nervioso.
- En algunos individuos se constata una intolerancia a la lactosa debido a una deficiencia en lactasa intestinal. En este caso, la adaptación a la lactosa debe hacerse progresivamente, permitiendo así la implementación de una flora intestinal que constituya a la lactasa y que permite metabolizar a la lactosa.
- Otra anomalía es la intolerancia específica a la galactosa, que puede dar lugar a la aparición de cataratas y de problemas nerviosos.
- Su poder edulcorante es muy bajo, hecho que fue considerado hasta hace unos años como un defecto, puesto que todo azúcar hacía referencia a la sacarosa.



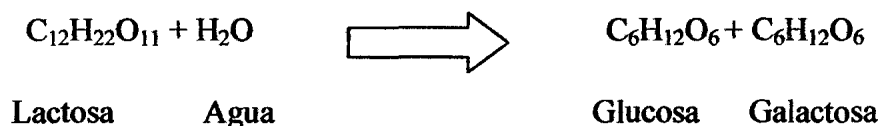
Actualmente, esta es una cualidad muy buscada para los artículos que son demasiado dulces, especialmente en confitería o en pastelería (Sottiez, 1993).

Tabla 04: Poder edulcorantes relativos de diferentes azúcares

Azúcar (carbohidratos)	Sacarosa: base 100
Sacarosa	100
Lactosa	39
Jarabe de glucosa	41
Maltosa	46
Sorbitol	51
Manosa	59
Galactosa	63
Xilosa	67
Manitol	69
Glucosa	72
Glicerina	79
Azúcar invertida	96
Isoglucosa	95 - 100
Fructosa	145

Fuente: Sottiez (1993).

La lactosa es poco soluble en comparación con el azúcar ordinario. Presenta un poder edulcorante seis veces menor que la sacarosa. En la leche este sabor dulce esta enmascarado por la caseína. La lactosa se hidroliza por β galactósidos y, por lo tanto la hidrólisis ha de ser de la siguiente manera:



La transformación más importante de la lactosa es de producir ácido láctico, la cual la realizan una gran cantidad de bacterias homo y heterofermentativas (Madriñan, 1988).



2.4.2. Vitaminas del lactosuero

El suero posee un contenido vitamínico importante, sobre todo de vitaminas del complejo B y de ácido ascórbico (Badui, 1977; Alcázar, 1992 y Gilles, 1974). Las vitaminas liposolubles son muy escasas, al carecer este subproducto de suficiente materia grasa (Badui, 1977 y Gilles, 1974). La presencia de muchas de estas vitaminas, lo hacen un medio de características positivas para el desarrollo de fermentaciones (Gilles, 1974).

2.5. Aplicaciones y productos actuales del lactosuero

Para que el suero pueda ser descartado al medio ambiente tiene que pasar por un tratamiento. Este tratamiento es bien costoso para las industrias lecheras, por tal razón, se buscan alternativas para la utilización del suero (Mawson, 1994). Entre las alternativas disponibles, está la utilización de los componentes del suero. Eso implica extraer los ingredientes principales como la lactosa y las proteínas. Las proteínas del suero se pueden recuperar por el proceso de ultrafiltración para luego ser vendidas en concentrado. La lactosa del suero puede ser fermentada utilizando levaduras para convertirla a etanol (Marwaha and Kennedy, 1988). Al menos 10 industrias lecheras a nivel mundial utilizan esta técnica para utilizar el suero (Mawson, 1994 y Murtagh, 1995).

Actualmente, el suero derivado de la producción quesera se utiliza para producir suero en polvo dulce y ácido, suero condensado, suero delactosado y desmineralizado,



obtención de proteína, lactosa, siropes, quesos, además de obtener alcohol etílico, vinagre y ácido láctico (Badui, 1977; Early, 2004; FAO, 2004; Furtado, 1999; Inda, 2000; Keating, 2002; Kosikowski, 1982 y Gilles, 1974). La desmineralización y la ultrafiltración del suero. Ambos métodos se utilizan para recuperar las proteínas que están presentes en el suero. Una vez recuperadas por dichos tratamientos, el restante del suero puede ser esparcido en la tierra como fertilizante (Gruetzmacher y Bradley, 1991).

El suero, por sí mismo, se trabaja sobre todo para la alimentación de ganado porcino y en menor medida para la alimentación de terneros. Esta práctica tiene el inconveniente que a medida que mayores proporciones del suero sean suministradas en la dieta de los animales, más probabilidad de diarreas debido a los problemas por no metabolizar adecuadamente la lactosa (Badui, 1977 y FAO, 2004).

El riego de sembradíos con lactosuero, ha sido utilizado con muchas restricciones. Este subproducto posee muchos nutrientes, aproximadamente, por cada tonelada líquida, 1.5 kg de nitrógeno, 0.35 kg de fósforo y 1.65 kg de potasio, además de calcio, magnesio, sodio y cloruros. También contribuye a mejorar la estructura del suelo, al hacerlo más fácil de trabajar, incrementando la infiltración de agua y reducir la erosión. Los resultados han sido favorables, al trabajar 100 toneladas por hectárea de superficie cultivada, sobre todo para la producción de maíz, trigo y pastura. Sin embargo, su aplicación se limita únicamente al inicio del proceso de siembra, limitando su uso en el resto de las etapas de producción (Badui, 1977 e Inda, 2000).



Además, esta técnica es cuestionada por muchos profesionales en el área zootécnica, debido a los efectos de acidificación en los terrenos a los cuáles se aplica (Soto, 2006).

Se han desarrollado también algunos quesos, basados en la coagulación de proteínas lactoséricas, por medio de un tratamiento térmico en condiciones ácidas y en presencia de calcio. Estos productos reciben el nombre de requesón, ricottone y Ricotta. Además, algunos países escandinavos, se producen los quesos tipo Mysost, que utilizan todos los sólidos del lactosuero, donde su procesamiento no requiere grandes inversiones. Su tecnología es esencialmente un proceso de concentración de sólidos, casi idéntica a la fabricación del dulce de leche, donde ocurren reacciones de pardeamiento no enzimático, y se desarrollan específicamente para untar o cortar (Inda, 2000).

El recobrar sólidos del suero, es una técnica muy utilizada en los años recientes. Sin embargo, para la pequeña industria existe la limitación de la inversión inicial del equipo (Badui, 1977).

En la industria de alimentos, se utiliza sobre todo el suero en polvo, como sustituto de la leche descremada deshidratada, por su menor costo. Sin embargo, una limitante de su aplicación es el sabor ligeramente ácido, similar a las frutas cítricas (Badui, 1977). También se le utiliza para la fabricación de bebidas de fantasía o deportivas, productos químicos o farmacéuticos, además de postres y alimentos preparados (Industria Alimenticia, 1992). Las características químicas de las proteínas del suero,



de poder solubilizarse en amplios rangos de pH, y su poder espumante, les proporciona excelentes condiciones en aplicaciones en la industria de alimentos. Además, estas proteínas, pueden aislarse y utilizarse en la alimentación infantil, debido a sus características nutricionales. Sin embargo, es necesario controlar el contenido salino en las formulaciones para infantes (Mabouis, 2004).

2.6. Utilización del suero lácteo como medio de cultivo

Independientemente de qué microorganismo se utilice, para que el proceso de producción del producto proteico y vitamínico sea económicamente favorable es necesario elegir un medio de cultivo sencillo y barato. Los microorganismos pueden usar como sustrato muchas sustancias carbonadas, como la celulosa, el metanol, el suero lácteo o los derivados del petróleo. El petróleo ofrece el mejor rendimiento en su transformación en alimentos, pero su demanda como combustible hace caro su uso en la industria alimenticia. Los residuos de celulosa procedentes de la madera u otras plantas son los candidatos más obvios para ser utilizados como medios de cultivo, pero son relativamente pocos los microorganismos capaces de usar la celulosa o la lignina, a menudo presente en ellos (Tortora et al., 1993).

Actualmente, existen varias alternativas biotecnológicas que usan al suero lácteo como medio de cultivo, aprovechando su composición química para la elaboración de distintos productos en la industria alimentaria y reduciendo el problema ecológico que generan sus componentes (Marth 1973; Grba et al., 2002 y Revillion et al., 2003).

2.7. La fermentación del lactosuero

El suero lácteo se utiliza como medio de cultivo para el desarrollo de algunos microorganismos. Muchos microorganismos pueden fermentar el suero, y por ello, se pueden obtener múltiples productos metabólicos de estos procesos (Gilles, 1974). El proceso de fermentación permite mejorar las características nutritivas de este subproducto, además de hacerlo más paladeable (Marth, 1973).

Para este proceso metabólico, deben seleccionarse microorganismos capaces de fermentar la lactosa, ya que es el único carbohidrato fermentable presente en el producto. Los productos fermentados, a partir del suero lácteo, son utilizados para alimentación animal, debido al alto contenido de vitaminas del complejo B. (Badui, 1977; Gilles, 1974 y Marth, 1973).

Aunque el suero posee algunas sales, es deficiente en compuestos nitrogenados inorgánicos, y deben ser suplementados si se desean desarrollar cierto tipo de fermentaciones (Marth, 1973).

En algunos estudios se reportó la presencia de sustancias estimulantes e inhibidoras en el lactosuero. Algunos investigadores señalan factores que favorecen el desarrollo del *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus leichmanis*, *Lactobacillus casei* y *Estreptococos lácticos heterofermentativos*. Por otro lado, al menos algunas veces, se inhibe el desarrollo de *Lactobacillus casei*,

Staphylococcus aureus, *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes viscolactis*, *Escherchia coli*, *Pseudomonas fragilis*, *Pseudomonas flourecens*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Marth, 1973).

La fermentación del suero lácteo es de vital importancia ya que a partir de ella se puede obtener muchos productos que tengan impacto económico y social como lo menciona Marth, (1973), la fermentación es importante por las siguientes características:

- a) Aprovechar todo el suero, para evitar residuos que deban ser tratados.
- b) Desarrollar un producto que pueda ser vendido con una utilidad.
- c) Aprovechar las propiedades nutritivas del suero.
- d) Mejorar su sabor y apariencia, para desarrollar un alimento más paladeable.

La fermentación más conocida del lactosuero, es la producción de levadura. Muchas de estas levaduras son utilizadas principalmente para alimentación animal (Gilles, 1974). Una limitante para su consumo humano, es la alta presencia de purinas y pirimidinas en las células de levadura, y que elevarían considerablemente los niveles de ácido úrico en la sangre. Una concentración excesiva de este ácido en la sangre puede ser causante de un ataque de gota (Marth, 1973).

Para la producción de alcohol etílico, se puede trabajar con *Saccaromyces fragilis*, o bien con *Torula cremoris*. El bajo contenido de lactosa, impide alcanzar



concentraciones superiores al 2.3% de alcohol etílico, a menos que el producto sea fortificado (Marth, 1973).

También se ha sintetizado vitamina B12 y riboflavina de forma exitosa. Sin embargo, el suero no constituye la fuente energética más económica para estas fermentaciones (Gilles, 1974). La presencia inferior al 5% m/v de lactosa en este subproducto, limita su uso en ciertas fermentaciones. La concentración del mismo, o bien su enriquecimiento con suero en polvo, puede elevar el contenido de lactosa. Sin embargo, la concentración de cenizas podría limitar el desarrollo de ciertos microorganismos (Marth, 1973).

2.8. Problemas derivados de la producción del suero lácteo

Uno de los problemas grandes que hoy día está teniendo la industria lechera es la disposición de suero obtenido durante la elaboración de quesos. Dicho suero posee como componentes principales a la lactosa (4.9%), proteínas (0.55%), grasa (0.04%), minerales (0.8%) y ácido láctico (0.4%) (Jelen, 1992). Aproximadamente el 47% de las 140 millones de toneladas de suero que se produce anualmente a nivel mundial se dispone en la tierra, plantas de tratamiento de agua, ríos, lagos y otros cuerpos de agua (Guimaraes, et al., 1992). Este dato implica una gran pérdida de recursos y un serio problema de contaminación debido a que el suero es altamente orgánico; con una alta demanda bioquímica de oxígeno (B.O.D) de 40,000 a 60,000 ppm y una demanda de



oxígeno producida químicamente (C.O.D.) de 50,000 a 80,000 ppm (Ben-Hassan and Ghaly, 1994). Más del 90% de esas demandas se deben a la lactosa. Cuando un compuesto con una alta (D.B.O.), tal como el suero lácteo, se vierte a un sistema ecológico acuático, los microorganismos que lo degradan demandan una gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua creándose condiciones anóxicas (Vrisseyre, 1980).

Para que el suero pueda ser descartado al medio ambiente tiene que pasar por un tratamiento. Este tratamiento es bien costoso para las industrias lecheras, por tal razón, se buscan alternativas para la utilización del suero (Tin and Mawson, 1993).

La leche en sí, posee un (D.B.O.) de 105 000 ppm. Ello se debe al alto contenido de sólidos en su matriz. Sin embargo, la industria lechera desecha más suero que cualquier otro producto lácteo, incrementando considerablemente la cantidad total de sólidos que van al desagüe (Badui, 1977). A pesar de que el suero posee un nivel (D.B.O.) inferior, una gran parte de los sólidos se desechan en ese medio. En ese sentido, es indispensable el tratamiento del suero, antes de ser eliminado y que constituya un grave contaminante (FAO, 2004).

A pesar de sus bondades, en los países productores de quesos no existen los medios adecuados para eliminar directamente el suero. La dilución en agua es la forma más común de eliminación, donde constituye un problema grave, debido a la fermentación de materia orgánica (lactosa y materia asociada), que genera el consumo del oxígeno soluble en agua (FAO, 2004).



Tomando en cuenta que la concentración del oxígeno disuelto es de 7 a 8 ppm para la mayoría de los cursos de agua, se necesita todo el oxígeno presente en 6000 litros de agua para oxidar los sólidos de sólo medio litro de leche entera (Vrisseyre, 1980).

También, se estima que la descarga a un curso de agua de 2,5 litros de suero por día tiene un poder contaminante equivalente al agua residual producida por un individuo. Esto implica, por ejemplo, que la manufactura de 1kg de queso ocasiona una contaminación semejante a la generada por aproximadamente cuatro personas (Ocampo et al., 2000).

La legislación vigente prohíbe la eliminación de suero lácteo en cursos de agua y estanques. También crea ciertas limitaciones en las plantas de tratamiento de aguas residuales ya que aparecen problemas al encauzarlo en zanjas y lagunas construidas para tal fin, pues el ácido láctico impermeabiliza el suelo, lo que impide la filtración, formándose así, espejos de agua putrefactos que inciden negativamente en la conservación del ambiente (Leyte et al., 2003).

Otro de los problemas que confronta la industria lechera en las últimas décadas es que el consumo de leche, al igual que los niveles de calcio en niños y adolescentes, ha disminuido debido a que prefieren el consumo de bebidas azucaradas y carbonatadas (Cavadini, et al., 2000 y Nielsen, et al., 2002). Hoy en día los productos líquidos a base de leche compiten con un sin número de bebidas entre ellas se encuentra agua embotellada, bebidas energizantes y té de limón (Boor, 2001). Entre los años del 1977

al 2001, los americanos aumentaron su ingestión de energía total debido al consumo de bebidas de frutas y azucaradas y reducción en la ingestión de leche. Este incremento fue de 2.8% a 7.0% de energía por parte de las bebidas azucaradas, esto se puede traducir en que se triplicaron las calorías de 50 kcal a 144 kcal (Nielsen and Popkin, 2004). Mientras que la energía adquirida por bebidas de frutas aumentó de un 1.1% a 2.2% de 20 kcal a 45 kcal. En comparación con las bebidas de frutas y azucaradas, la energía adquirida por parte de la leche disminuyó de un 8.0% a 5.0% de 143 kcal a 99 kcal (Nielsen and Popkin, 2004).

Esto es interesante porque durante los años del 1977 al 1996 el consumo de bebidas azucaradas aumentó alrededor de un 15% mientras que el consumo de leche disminuyó un 12%. Un estudio realizado a la población americana mostró que estos prefieren tomar bebidas azucaradas en sus comidas y meriendas en vez de consumir leche (Nielsen and Popkin, 2004). También se ha encontrado que el aumento en el consumo de bebidas azucaradas ha tenido un efecto sobre la obesidad y los desordenes metabólicos en la población americana (Nielsen and Popkin, 2004). Esta es una de las razones por la cual el Departamento de Salud desarrolló una campaña contra la epidemia de la obesidad debido a la alimentación deficiente que tiene la población americana (Nielsen and Popkin, 2004).

La industria lechera ha tenido que recurrir a nuevas estrategias para aumentar el consumo de leche en niños y adolescentes, y para combatir las adversidades propiciadas por las bebidas (azucaradas, carbonatadas y frutadas) que se encuentran en

el mercado de alimentos. Esas estrategias incluyeron desarrollar una campaña publicitaria demostrando que la leche es una fuente importante de calcio, vitamina D y proteínas para el desarrollo de niños y adolescentes (Nielsen and Popkin, 2004). Se ha desarrollado nuevos empaques y tamaños más atractivos para el consumidor y que se adapten a los estilos de vida modernos. Nuevos productos se han integrado al mercado como leche con sabores (vainilla, chocolate, fresa y guineo), yogurt líquido y leches fermentadas (kéfir) las cuales están ganando popularidad por sus beneficios para la salud (Boor, 2001).

2.9. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica

El etanol es producido por muchas especies de levaduras, bacterias y mohos. Los métodos iniciales emplearon por lo general exclusivamente levaduras, como agentes de la fermentación; en la fabricación de alcohol, whisky y cerveza; se emplean casi siempre cepas aclimatadas de *Saccharomyces ellipsoideus* y *Saccharomyces pastorianus*; en la fermentación de líquidos orientales y tropicales, se utilizan otras diversas especies de los géneros *Saccharomyces* y *Schizo sacharomyces* (Kirk y Othmer, 1961).

Entre las distintas levaduras capaces de fermentar la lactosa, convirtiendo en etanol, son *Saccharomyces fragilis* y *Cándida pseudotropicalis* (*Torula cremoris*), las que a



menudo tenían una velocidad de fermentación alta y que producían los más altos rendimientos de alcohol (Foster, 1969).

Otras levaduras fermentadora de lactosa, examinadas por (Rogosa, et al., 1947) son: *Torula cremoris*, *torula lactosa*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces anamensis*, *Cándida pseudotropicalis*, *Torula kéfir* y *Zygosaccharomyces lactis*.

(Gawel y Kosikowski, 1978). Realizaron estudios utilizando *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces bulgaricus*. Así mismo, otros autores como (Chu y Tzeng, 1979; Antonov et al., 1979; Burges y Kelly, 1979; Cunningham, 1979; Demott, 1981; Matvievsckaya et al., 1975 y Chen y Zall, 1982). Han estudiado estas levaduras y su acción fermentativa sobre la lactosa para convertir en etanol.

2.9.1. *Kluyveromyces fragilis*

La levadura *Kluyveromyces fragilis* se aisló por primera vez en 1909 por Jorgensen del Kefir, nombrándola *Saccharomyces fragilis*. Los primeros autores en cambiar el lugar taxonómico fueron Wickerham en 1955 y Wickerham y Burton en 1956. Ellos señalaron la heterogeneidad del genero *Saccharomyces* y anunciando su intención de establecer un genero separado (que se llamaría *Dekkeromyces*) para acomodar a *S. fragilis*, *S. marxianus*, *S. lactis*. Kudriavzev en 1954, propuso ubicar la especie diploide (como *S. fragilis*) en un nuevo género *Fabospora* y especies con células

vegetativas haploides (como *Schizoscharomyces marxianus*) en otro género, *Zygozopora*. En 1960 Kudriavzev , diagnosticó los dos géneros, resultando en un nombre, *Fabospora fragilis* (Jorgensen). En género *Kluyveromyces fragilis*, fue originalmente establecido por van de Walt en 1956. El nuevo nombre de *Fabospora fragilis* se volvió *Kluyveromyces fragilis* (Jorgensen) van de Walt 1909.

El siguiente desarrollo de la nomenclatura ocurrió como resultado del estudio de Bicknell y Douglas en 1970, quienes determinaron por experimentos de reasociación de DNA que *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces marxianus* compartían 93% de las secuencias de DNA y por tanto serían sinónimos. Estas dos especies difieren sólo en que la lactosa es débilmente fermentado por *Kluyveromyces marxianus* pero rápidamente fermentado por *Kluyveromyces fragilis* (Phaff, 1985).

Los resultados se confirmaron totalmente por Phaff en 1978, quien reportó entre 90 % y 100% de complementación de DNA no solo entre *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces marxianus*, también entre especies *Kluyveromyces bulgaricus*, *K. cicerisporus* y *K. wikenii* con *K. marxianus* como especie de referencia. Como *K. marxianus* es el nombre más antiguo, tiene prioridad sobre las otras cuatro especies, las que se volvieron sinónimos de *K. marxianus* (Phaff, 1985).

Actualmente las bases de datos del centro nacional de información en biotecnología, reporta 17 géneros de *Kluyveromyces maxianus* (NCBI, 1999).

El desarrollo en agar malta de *Kluyveromyces fragilis* después de tres días a 28 °C es de forma globosa de elipsoidales a cilíndricas (2-5.5) x (3.5-110) μ . Se presentan individuales o en pares o en cadenas cortas, las cuales pueden ser ramificadas. Usualmente forman pseudomicelio. El cultivo es butiroso, color crema a crema ligeramente marrón, aspecto brillante o un poco opaco, algo extendido y chato, liso u ondulado, el borde puede ser ondulado o lobulado, en ocasiones algo ribeteado (Peña, 1984).

2.9.1.1. Características asimilativas de *Kluyveromyces fragilis*

Tabla 05. Asimilación de compuestos de carbono por *Kluyveromyces fragilis*

Glucosa	+	D-robosa	±
Galactosa	+	L-Ramnosa	-
L-Sorbosa	±	Etanol	+
Sacarosa	+	Gliserol	+
Maltosa	-	Eritritol	-
Celobiosa	+	Ribitol	±
Trealosa	-	Galactitol	-
Lactosa	+	D-manitol	+
Melibiosa	-	D-glucitol	+
Rafinosa	-	A-metil-D-Glucósido	-
Melezitosa	-	Salicina	+
Inulina	+	DL-Acido láctico	+
Almidón soluble	-	Ácido succínico	+
D-Xilosa	+	Acido cítrico	±
L-Arabinosa	+	inositol	-
D-Arabinosa	-		

Fuente: Lodder (1970).

Donde:

- + Significa asimilación (crecimiento).
- Significa no asimilación.



2.9.1.2. Características fermentativas de *Kluyveromyces fragilis*

Tabla 06. Fermentación de azúcares por *Kluyveromyces fragilis*

Glucosa	+	Melibiosa	-
Galactosa	+	Rafinosa	+
Sucrosa	+	Melexitosa	-
Maltosa	-	Inulina	-
Celobiosa	-	Almidón soluble	-
Trealosa	-	A-Metil-D_Glucósdo	-
Lactosa	+		

Fuente: Lodder (1970).

Tabla 07. Patrón de asimilación de *Kluyveromyces fragilis*, comparadas con otras especies de levaduras crecidas comercialmente

Nutriente	<i>K. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. uvarum</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Glucosa	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Sucrosa	-	+	+	+	+
Lactosa	+	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	+	+
KNO ₃	-	-	-	+	-
Etolol	+	(+)	-	+	-

Fuente: Lodder (1970).

Por otro lado, al evaluarse especies de *Kluyveromyces* para la toma de lactosa se dividió en tres grupos (Carvalho y Spencer Martins, 1990) que se menciona a continuación:

- a) Grupo I: fermenta la lactosa, glucosa y galactosa, hidroliza la lactosa extracelular y se da la difusión facilidad aparente de glucosa y galactosa.

- b) Grupo II: no fermenta la lactosa, pero si fermenta la glucosa y galactosa, el transporte es por un protón simporte aparente y la hidrólisis de lactosa es extracelular.
- c) Grupo III: fermenta la lactosa, glucosa y galactosa, el transporte de la lactosa es por un aparente mecanismo de protón simporte, la hidrólisis de la lactosa es extracelular y modos de transporte de glucosa y galactosa variables.
- d) De otro lado, (Kilian et al., 1991), determinó que el sistema de transporte (H⁺ simporte), para una o más azúcares (glucosa, galactosa, fructuosa, rafinosa y sacarosa), ocurre en el 57% de las 21 especies que representaron el género de *Kluyveromyces*.

2.9.2. *Kluyveromyces lactis*

Las habilidades fermentativas y asimilativas de *Kluyveromyces lactis* se desarrollo en agar malta, la formación de ascosporas y la fermentación (Lodder, 1970).

El desarrollo en agar malta, después de tres días a 28°C las células son esféricas, elipsoidales y ocasionalmente cilíndricas (2.0 – 5.5) μ x (3.0 – 7.0) μ individuales en pares y ocasionalmente en pequeños racimos o masas aglutinadas, células ameboideas pueden estar presentes. El cultivo es butiroso de color crema a crema ligeramente marrón, ocasionalmente con un matiz rosado, brillante a algo opaco

liso, y a veces segmentados con algunas estructuras cerca del borde, plano y extendido. El borde varía de entero a ondulado (Lodder, 1970).

Las ascosporas cuya forma pueden variar desde esféricas hasta oblongas elipsoidales, son de 1 a 4 ascas. Las ascosporas son rápidamente liberadas del asca y tienden a aglutinarse (Lodder, 1970).

La fermentación de *Kluyveromyces lactis* es (+) al fermentar glucosa, galactosa (+), sucrosa (+) raramente negativo, maltosa (-) raramente positivo débil, celobiosa (-), lactosa (+), melibiosa (-), rafinosa (+) raramente negativa, melizitosa (-) ó (+), inulina (-), almidón soluble (-), α -metil D glucosidasa (-) (Lodder, 1970).

2.10. Generalidades de Biorreactores

Los Biorreactores son aparatos donde se desarrollan una serie de reacciones, por la acción de microorganismos o enzimas, bajo un ambiente controlado en el que se pretende un crecimiento celular o la producción de metabolitos de interés con una eficiencia óptima. Para lograr un proceso fermentativo es necesario tener en cuenta que los microorganismos necesitan ciertos elementos nutricionales (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y nutrientes específicos), para activar su metabolismo celular; adicionalmente, es indispensable la determinación y selección de las variables a medir, controlar y manipular en el curso de la fermentación (temperatura, velocidad

de agitación, concentración de nutrientes, presión, oxígeno disuelto, pH, Acidez, entre otros), para mantener una concentración óptima de crecimiento (Pachón, 1997).

2.11. Biorreactores utilizados en la fermentación

La literatura reporta dos tipos de sistemas de fermentación, que son los sistemas de homogéneos y heterogéneos (Divies et. al., 1994).

2.11.1. Biorreactores con sistema de fermentación homogéneos

Estos sistemas tienen una distribución uniforme de la biomasa microbiana en el medio de reacción. Se puede obtener mediante la recirculación de biomasa por:

- a) Centrifugación, siendo la desventaja su mantenimiento, además este proceso disminuye la viabilidad de las levaduras debido al estrés a la que se someten.
- b) Reactor de membrana, siendo este un sistema menos flexible que la centrifugación debido al problema de obstrucción y no obstrucción de la membrana que todavía no ha sido resuelto. Otra limitación, es el flujo específico de estas membranas, que debe llegar a 200-300L/h para que sea económicamente viable.

2.11.2. Biorreactores con sistema de fermentación heterogéneo

Se distingue dos fases: el medio líquido para ser transformado y la fase sólida conteniendo la biomasa, siendo los principales diseños de reactores:

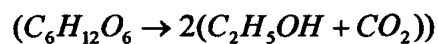
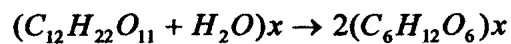
- a) Adsorción, las levaduras forman biofilms sobre la superficie del soporte, pero un incremento de velocidad y/o turbulencia del líquido, autólisis de las células y la

liberación de grandes cantidades de gases causa una gran inestabilidad al biofilm formado. Finalmente, el acceso de oxígeno a las células es un problema específico que es difícil de resolver.

- b) Floculación, la floculación involucra la decantación, método basado de distribución líquido – sólido. El proceso de fermentación requiere de la configuración de un reactor en forma de torres que soporten a la biomasa por la cual pasara el líquido que será transportado o puede ser agitado para dar un lecho fluidificado o en reactor con agitación.

2.12. Producción de una bebidas fermentada de lactosuero

La fermentación alcohólica inicia con Lavoisier en 1787, luego Gay-Lussac en 1820 y Dumas en 1840, identificaron los primeros productos de la fermentación alcohólica (alcohol etílico, anhídrido carbónico y un poco de ácido acético) y representaron el desdoblamiento de los azúcares por la ecuación química siguiente (Bremond, 1966; Kretschman, 1961).



En 1960, Pasteur demuestra que se forman diversos productos secundarios, particularmente glicerina y ácido succínico. Más tarde se identificaron otras sustancias como: ésteres, aldehídos, alcoholes superiores, ácido láctico, etc. En pequeñas cantidades (Bremond, 1966).

El grado alcohólico representa el número de litros de alcohol puro contenido en 100 litros de vino. Si de 100g de azúcar se produce 48.4g de alcohol etílico de densidad 0.79, para obtener 1 litro de alcohol será necesario 1.640g de azúcar, de otra forma se dice que 16.4g/L corresponde a 1 grado de alcohol. Por lo tanto, conociendo la cantidad de azúcar de un mosto (por densidad o refractometría), será suficiente dividir este número por 17 para conocer el grado alcohólico probable (Bremond, 1966).

Por otro lado, la cantidad de azúcar necesaria para producir un grado alcohólico (índice de refracción) varía con la especie de levadura y las condiciones de fermentación. Se reporta el valor de 17g a 18g de azúcar para la levadura elíptica (*S. cerevisiae* var. *Ellipsoideus*), 21g – 22g para la levadura apiculada (*Kloeckera apiculata*) y 20g para la levadura pasteur (*S. pasteurianus*) (Mareca, 1968; Negre y Francot, 1980).

Cuando un mosto es inoculado por levaduras, la producción de etanol no es inmediata (Pena, et. al., 1972). En efecto, ciertas enzimas esenciales de la fermentación alcohólica (piruvato decarboxilasa, y alcohol deshidrogenasa I) son inducibles por la glucosa (Rieger et. al., 1983; Sharma y Tauro, 1986) y no son pues expresadas en sus

niveles máximos al principio de la fermentación alcohólica. En consecuencia, numerosos compuestos además del etanol, son formados al comienzo de la fermentación: dióxido de carbono, glicerol, piruvato, succinato, y otros ácidos orgánicos (Ribéreau et. al., 1956).

Tabla 08. Productos formados por la fermentación de 170g de azúcar

Cantidades medidas en mg/litro			
Alcohol	80,000	Alcoholes superiores	300
Gas carbónico	76,000	Ácido citramálico	80
Glicerol	6,000	Acetaldehído	80
Ácido succínico	800	Ácido pirúvico	60
Butilenglicol	400	Ácido – α - cetoglutárico	40
Ácido acético	300	Acetato de etilo	4
Ácido láctico	300	Acetoína	10

Fuente: Mareca (1968); Negre y Francot (1980).

2.13. Bebida alcohólica de suero

El desarrollo de bebida para consumo humano, a partir de suero lácteo ha sido posible en los últimos años. Muchos de estos productos, se puede elaborar pasteurizados, fortificados, saborizados y también se puede hidrolizar la lactosa por medios enzimáticos (Inda, 2000).

La utilización del suero tanto para la producción de etanol o de bebidas, ha estado ligado a la eliminación de las proteínas mediante diferentes métodos como la ultrafiltración (Sienkiewicz, 1980) y tratamiento térmico (Al-Dabbagh, 1980).



Para producir vino a partir de suero se utiliza *Kluyveromyces fragilis* y la levadura Montrachet. Para la fermentación se agrega 22% de dextrosa dependiendo de la cantidad de alcohol deseado (no siendo necesaria la adición de otro nutriente), 100 ppm de sulfuroso y para la clarificación se usa bentonita (0,5%) (Yang et al., 1977).

De otro lado, (Gawel y Kosikowski, 1978), utilizaron lactasa y *Saccharomyces cerevisiae* para hidrolizar la lactosa y fermentar los monosacáridos hasta etanol. Para la fermentación se usa 24% de lactosa, 0,25 – 1g de enzima lactasa/L y 2% de inóculo, obteniéndose un vino de características aceptables. Conteniendo 11 a 12,2% de etanol (10 días – 15 días de fermentación a 30°C). La eficiencia de la fermentación estuvo dentro del rango del 76% – 81%. También existe un tipo de bebida fermentada de suero, en la que se usa las levaduras de vinificación y suero suplementado. Este tipo de bebida se elabora en cinco pasos: clarificación, desproteínización, fermentación, eliminación de cenizas y filtración. El contenido de esta bebida alcohólica es de 8°GL, 6% a 9% de azúcar, 2% a 4% de extracto natural y 0.2% a 0.5% de ácidos orgánicos (Palmer, 1979).

El alcohol obtenido en la planta Carbery de Irlanda, se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas. También se puede obtener directamente bebidas alcohólicas a partir de suero, principalmente tipo cerveza y vinos. Las alternativas son similares a las discutidas para producción de alcohol: fermentación con *S. cerevisiae* de suero

concentrado con lactosa hidrolizada o adicionando azúcar y fermentación con *K. marxianus* o *K. lactis* (Garibay et al., 1993).

El desarrollo de una bebida fermentada a partir de suero con cultivos prebióticos, responde a la necesidad de un producto funcional económico, donde se aprovecha un subproducto de alto valor nutritivo de la producción de queso fresco. La utilización de cultivos fermentadores, busca promover la hidrólisis de la lactosa. Además, desde el punto de vista de mercadeo, constituye una excelente alternativa, ya que, mundialmente, hay una tendencia hacia productos saludables y funcionales (Sloan, 2006).

El consumidor de hoy en día desea nuevas alternativas a las bebidas tradicionales. Todo el segmento de bebidas embotelladas saludables tiene una gran tendencia al aumento en ventas (Stevenson, 2002). En esta categoría podría catalogarse este nuevo producto. Ello representaría un excelente complemento para la diversificación de productos Agroindustriales y dar un valor agregado al producto del pequeño productor lácteo de Apurímac.

2.14. Análisis sensorial y fisicoquímico de la bebida

2.14.1. Análisis sensorial

La evaluación sensorial de los alimentos constituye como una de las más importantes herramientas para el logro del mejor desenvolvimiento de las actividades de la industria alimentaria. La calidad sensorial de las bebidas puede ser definido como el

método experimental mediante el cual los jueces perciben y califican, caracterizando y mensurando, las propiedades sensoriales de muestras adecuadamente presentadas, bajo condiciones ambientales preestablecida y bajo un patrón de evaluación acorde al posterior análisis estadístico (Ureña, M. y Arrigo, M., 1999).

La evaluación sensorial es una disciplina científica mediante la cual se evalúan las propiedades organolépticas a través del uso de uno o más de los sentidos humanos (Morales, 1993).

Mediante esta evaluación pueden clasificarse las materias primas y productos terminados, conocer que opina el consumidor sobre un determinado alimento, su aceptación o rechazo, así como su nivel de agrado, criterios estos que se tienen en cuenta en la formulación y desarrollo de los mismos (Morales, 1993).

Son diversas las aplicaciones de esta ciencia, la cual desempeña un papel clave en el ciclo de vida de un producto, de ahí que no se concibe el análisis de un alimento, si no va aparejado de la evaluación de sus propiedades organolépticas mediante pruebas sensoriales, destacándose la importancia de dicha disciplina no sólo en la actualidad sino también en el futuro (Morales, 1993).

El sabor y aroma es uno de los factores que se tiene en cuenta en la calidad sensorial de una bebida láctea, el sabor de una bebida es percibido por tres de los cinco sentidos del consumidor; gusto, tacto y olfato. Por lo tanto, al escoger una bebida se debe

buscar características generales de un sabor aceptable, sensación agradable en la boca; así como la desaparición del sabor al deglutir y la ausencia de características desagradables que se perciben en el primer impacto (Desrosier, 1988).

La textura de una bebida se refiere principalmente a la cantidad de grasa y agua, además del contenido de carbohidratos y proteínas que contiene la bebida. En el caso de la bebida láctea, es un factor que raras veces suele ser uniforme debido a la naturaleza de la materia prima. Por lo tanto, el uso de estabilizadores es esencial en la elaboración de bebidas lácteas (Fellows, 1994).

El color de una bebida es la primera clave de su identificación, además de que frecuentemente predice el grado de satisfacción o placer que se obtendrá al consumirlo. Explica además, que en los productos naturales, la asociación de la calidad con el color es muy fuerte, ya que para el consumidor la intensidad del color con frecuencia significa la intensidad del sabor (Desrosier, 1988).

2.14.2. Análisis fisicoquímico

Después del agua el constituyente más abundante en la bebida es el alcohol etílico. Se produce junto con el anhídrido carbónico, en la fermentación, a razón de un gramo de alcohol por cada 1,6 g de sustrato hidrocarbonado transformado. Participa de forma importante en el sabor de la bebida (Sendra y Carbonell, 1999).



Los carbonatos producen efectos muy variados en el sabor, el sodio tiene un efecto importante sobre el sabor global, mientras que el magnesio puede conferir un sabor desagradable. Por otra parte, el hierro, plomo, cobre, cinc y estaño puede producir turbidez en la bebida (Sendra y Carbonell, 1999).

La mayoría de estos componentes proceden exclusivamente de las materias primas de partida, especialmente de la leche. Este es el caso del potasio, sodio, calcio entre otros, aunque las concentraciones pueden sufrir cambios importantes en el proceso (Sendra y Carbonell, 1999).



III. PARTE EXPERIMENTAL

La investigación tuvo lugar en las instalaciones de la Universidad Nacional “Micaela Bastida de Apurímac” – Perú. La producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, escuela académico profesional de Ingeniería Agroindustrial. Para lograr la presente investigación se trabajó por etapas que fueron cronológicamente desarrollados y se explica en la sección 3.3.

En la investigación se utilizó cepas de levaduras nativas, las cuales se aislaron de nichos naturales, para ello se tomaron muestras de lactosuero de la empresa FONDEGAB de Abancay que fueron subproductos de la elaboración del queso fresco. Luego, se realizó un estudio de identificación basado en técnicas morfológicas y fisiológicas. Cabe mencionar que las pruebas fisiológicas utilizadas en identificación de levaduras son las de fermentación, asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos y termo tolerancias, lo cual es laborioso y complejo que no permitió determinar la especie de la levadura aislada, pero si podemos confirmar con las pruebas realizadas que se ha aislado y trabajado con una cepa específica.

3.1. Aislamiento, mantenimiento e identificación de levaduras

Las muestras utilizadas para el aislamiento de levaduras fueron tomadas de nichos naturales, a partir de lactosuero que son subproductos de la elaboración del queso

fresco.

Esta muestra fue tomada de la empresa FONDEGAB de Abancay – Perú. Las muestras que se recolectaron proceden de prácticas cotidianas de la elaboración de queso fresco.

3.1.1. Aislamiento de levaduras

Se tomó un volumen de 5 ml de lactosuero que fue llevado a un tubo de ensayo en seguida se adicionó 10 ml de solución Rauling y se dejó en reposo a temperatura ambiente $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. El principio se basa en la actividad isotónica que produce la solución Rauling frente a la pared celular de bacterias.

Después de 24 horas se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en agua peptonada estéril al 1% a partir de la muestra que contiene solución Rauling, de las diluciones se tomaron aseptícamente 0,5 ml que se sembraron en profundidad en agar Saboreaud. Posteriormente se llevó a incubación durante 48 horas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, al observar crecimiento en las muestras fueron sembrados por estrias en tubos de ensayo con agar inclinado de igual composición, fue necesario ajustar el pH a 5.6 para el mejor adaptación de las levaduras en seguida se incubaron durante 48 horas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y por último se sembraron en medios de cultivo sabouraud hasta su purificación.

Tabla 09. Composición química para 100 ml de solución Rauling

Peptona	0.50 g
NaCl	0.85 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0.90 g
KH ₂ PO ₄	0.15 g
Agua destilada	100 ml
pH	5.6

3.1.2. Mantenimiento de cepas aisladas

Las cepa aislada, luego de haber sido repicada en tubos con agar inclinado se conservaron a 6°C con la finalidad de preservar la pureza genética sin perder ninguna de sus propiedades bioquímicas, cabe mencionar que la cepa se repicó cada 3 meses en agar de la misma composición con la finalidad de preservar los niveles de su productividad, logrando que el cultivo pueda ser manejado con facilidad y no exista ninguna contaminación.

3.1.3. Identificación de cepas de levadura aisladas

La identificación del género se realizó mediante la técnica de microscopia y estudio fisiológico. Para la determinación morfológica se utilizó un microscopio óptico Revelatium 3, USA. Así mismo, en los ensayos de fisiología se utilizaron los siguientes carbohidratos: glucosa, galactosa, maltosa, almidón y lactosa, con la finalidad de evaluar la capacidad fermentativa y asimilativa de los carbohidratos.



3.1.3.1. Estudio morfológico de cepas aisladas

Los criterios morfológicos son muy útiles para la identificación de colonias puras. Para ello se procedió a preparar las muestras fijas en portaobjetos para su observación al microscopio óptico (Revelatium 3, USA) con un aumento de 40X, así se determinaron el color, textura y la forma de las colonias que fueron aisladas.

3.1.3.2. Estudio fisiológico de cepas aisladas

El estudio fisiológico se realizó cultivando las cepas aisladas en un medio de cultivo líquido con la siguiente composición: 2 % w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5,6. Se utilizó la técnica de fermentación en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham, para ello se tomó unas asadas de cada colonia crecida en agar Saboreaud y se inoculó directamente en los tubos de ensayo, de manera que todo el procedimiento sea estéril y no produzca alteraciones en el estudio fisiológico de las levaduras, luego se llevó a incubación por 48 horas a $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, realizando el monitoreo de la formación de CO_2 , formación de film, precipitación y la formación de espuma, este monitoreo se realizó a las 24 horas y 48 horas.

Los estudios fisiológicos correspondieron la evaluación de tolerancia al etanol exógeno, tolerancia al ácido acético exógeno, tolerancia al etanol exógeno y estudio de producción de etanol.



a) Tolerancia al etanol

La tolerancia de las cepas aisladas al etanol exógeno se determinó evaluando su capacidad fermentativa. Se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2 %w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, al cual se le añadió etanol a 96% v/v hasta alcanzar concentraciones en los tubos de 2% v/v, 4% v/v, 6% v/v y 8 % v/v respectivamente. La temperatura de fermentación fue $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se realizo el control de los resultados a las 24 y 48 horas.

b) Tolerancia al ácido acético

La tolerancia de las cepas aisladas al ácido acético se realizó evaluando su capacidad fermentativa, para lo cual se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2% w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, al cual se agregó ácido acético 98% v/v, hasta alcanzar concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L y 500 mg/L respectivamente, la fermentación se realizó a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los resultados se evaluaron a las 24 horas y 48 horas.

c) Estudio de producción de etanol

El estudio de producción de etanol se realizó con la finalidad de determinar la capacidad fermentativa de las cepas de levadura aisladas utilizando lactosuero desproteinizado. Este estudio se realizo a escala de matraces, se diseño y construyó las gargantas de cisne con sus respectivos tapones como se muestra en el apéndice 04, las

gargantas de cisne mantiene un cierre hermético y adicionado glicerol que evitó el ingreso de los microorganismos del medio externo, una vez obtenido el medio de cultivo estéril y a temperatura ambiente 20°C se realizó la inoculación del 5%, la fermentación se realizó a 29°C ±1°C. Esta etapa se realizó con la finalidad de conocer el grado de tolerancia al etanol de cada una de las cepas y la tolerancia al etanol producido por ellas mismas durante la fermentación alcohólica y que nos permitió seleccionar a la cepa que produce mayor cantidad de etanol en menor tiempo como uno de los factores importantes.

3.2. Preparación del lactosuero

3.2.1. Obtención y acondicionamiento del lactosuero

El lactosuero que se trabajo en la presente investigación fue recogido de la empresa FONDEGAB (primer desuerado de la elaboración del queso fresco) seguidamente se refrigero a 4°C, por un tiempo máximo de 24 horas, si este no era utilizado al momento de la recepción. Para el acondicionamiento del suero, fue necesaria la desproteinización y regulación del pH, en la desproteinización se realizó numerosos tratamientos térmicos como pruebas preliminares en el laboratorio y se considero como mejor tratamiento térmico al que presento mayor proporción de sedimentación de la proteína y menor turbidez.

Establecido el tratamiento térmico óptimo, se dejó en reposo con la finalidad de que las partículas que están en suspensión sedimenten y poder retirar los residuos más gruesos, posteriormente se filtró con papel Whatman N° 1.

3.2.2. Caracterización fisicoquímica del suero desproteinizado

- a) **Contenido de grasa.** Se empleó como alternativo, el método Gerber. Que consistió en la liberación total de la grasa por disolución de las sustancias proteicas, separación de la grasa por centrifugación y posterior medida volumétrica (Pearson, 1976). Los análisis se realizaron por triplicado.
- b) **Contenido de proteínas.** La determinación del nitrógeno total se realizó aplicando el método Kjeldahl, pero ha sido necesario realizar la preparación del lactosuero antes de iniciar con el método (AOAC, 1990).
- c) **Contenido de caseína.** Se entiende por contenido en caseína del suero de leche el contenido en proteínas, expresado en porcentaje en peso, siguiendo el procedimiento expuesto por AOAC (1990).
- d) **Contenido de lactosa.** Se entiende por contenido en lactosa del suero de leche el contenido en lactosa monohidratada expresado en porcentaje en peso, determinado por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde al descrito por NTP 202.109 (1988).
- e) **Acidez.** Se entiende por acidez en el suero de leche, certificada, higienizada y esterilizada el contenido aparente en ácidos, expresado en g de ácido láctico por 100 ml de suero, determinado por el procedimiento expuesto a continuación, que corresponde al descrito en la NTP 202.116, (1998).



- f) **pH.** Se determinó utilizando el método directo de medición con un pH metro
- g) **Densidad.** Se utilizó el método pignométrico.

3.3. Preparación de inóculo

El medio de crecimiento para el inóculo fue suero desproteínizado conteniendo 2% de lactosa y pH ajustado a 5.6. Se colocó 100 ml de suero desproteínizado en Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, la propagación del inóculo se realizó a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 100 rpm durante 48 horas en un agitador orbital como se muestra en el apéndice 4.1.

3.4. Fermentación del lactosuero

Esta parte de la investigación se realizó en un biorreactor estándar de acero inoxidable con capacidad de 25 litros utilizándose un volumen de trabajo de 1/5 del volumen total y como iniciador la levadura que demostró mayor % de etanol y en menor tiempo de conversión en las pruebas preliminares que se realizó a escala de laboratorio.

Esta etapa corresponde al diseño experimental propuesto, es aquí donde se manipularon las variables independientes (factores de entrada) como la velocidad de aireación de 0L/min y 0.8L/min, la concentración de inóculo para la fermentación alcohólica en 2% v/v y 5% v/v respectivamente. La temperatura de fermentación se controló a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 96 horas, los controles se realizaron cada 12 horas.

En la figura 01: Se detalla el flujo de elaboración de la bebida fermentada a partir de lactosuero.

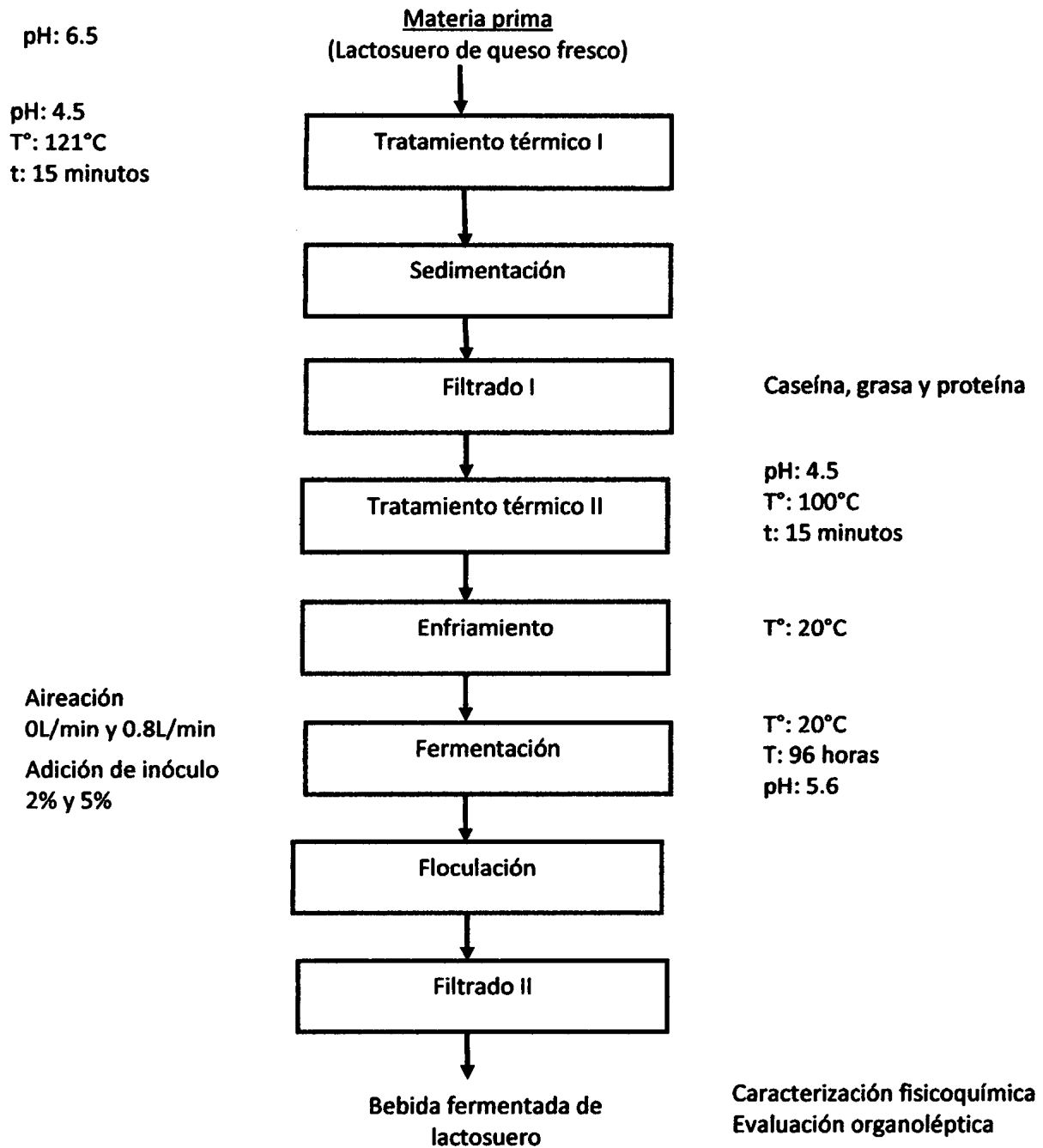


FIGURA 01: Diagrama de flujo para la elaboración de una bebida fermentada a partir de lactosuero



3.5. Evaluación de calidad de la bebida fermentada

En esta parte de la investigación se determinó la calidad sensorial y nutricional de la bebida fermentada de lactosuero. Se realizaron análisis fisicoquímicos y sensoriales.

3.5.1. Evaluación fisicoquímica

La evaluación fisicoquímica de la bebida fermentada de lactosuero incluyeron; la determinación de proteína mediante la técnica micro Kjeidahl (AOAC 920.53), contenido de grasa se utilizo el método de Gerber, contenido de caseína utilizando la norma FIL-20: 1964 de la Federación Internacional de Lechería, contenido de lactosa que corresponde al descrito en la norma FIL-28:1964 de la Federación Internacional de Lechería, acidez total expresado en ácido acético mediante la técnica de valoración potenciométrica, concentración de etanol mediante la técnica de picnometría, pH por potenciómetro y el peso específico. El porcentaje de etanol, peso específico, la acidez total y el pH se evaluaron cada 12 horas durante la fermentación.

Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de biotecnología, procesamiento de productos agroindustriales y química de la Facultad de Ingeniería, Escuela Académico profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional “Micaela Bastidas de Apurímac”.

3.5.2. Evaluación sensorial

Se realizó un sondeo sensorial del nuevo producto. Para ello se utilizó un método de aceptación con escala ideal, basado en la prueba hedónica de aceptabilidad así como la prueba descriptiva cuantitativa para atributos de color, aroma y sabor. Las características de realizó de acuerdo a la norma ISO 4121-1987.

El diseño o interpretación correcta de los resultados de la evaluación sensorial, requiere del conocimiento de los aspectos psicológicos y fisiológicos de los analizadores humanos, que se definen como un mecanismo nervioso complejo, que empieza en un aparato receptor externo y termina en la corteza cerebral.

Las características organolépticas de los alimentos, constituyen el conjunto de estímulos que interactúan con los receptores del analizador (órganos de los sentidos). En el análisis sensorial es el hombre el instrumento de medición, es decir los jueces que participan en las diferentes pruebas de evaluación sensorial, por ello los panelistas conformaron por jueces semientrenados, para la selección de los jueces se tomó a los individuo que entre un grupo de candidatos ha demostrado una sensibilidad sensorial específica para uno o varios productos (sabores básicos). Para la selección se tomó en cuenta algunos aspectos personales de los jueces analíticos entre ellos tenemos la edad de los jueces, sexo, estado de salud, carácter y responsabilidad, afinidad con la bebida a evaluar y disponibilidad.

Cabe mencionar que la evaluación sensorial se hizo con la finalidad de evaluar la aceptabilidad de la bebida fermentada a partir de lactosuero y no compararla con alguna otra bebida comercial específica que exista en el mercado.

Los jueces recibieron un entrenamiento básico para evaluar aromas y sabores específicos encontrados en la bebida fermentada a partir de lactosuero, entre ellos; acetaldehído, suero, diacetilo, levadura, acidez, amargor, metálico, alcohólico y levadura. Se utilizaron cartillas de respuesta para recolectar las puntuaciones obtenidas por cada juez (ver modelo de cartilla en el apéndice 01) y posteriormente se evaluaron estadísticamente. El tratamiento estadístico se realizó con el programa Statgraphics que contienen un gran número de funciones especiales, como el análisis de varianza, o el procedimiento ANOVA que está diseñado para construir un modelo estadístico que describe el impacto de un solo factor categórico X en una variable dependiente Y. se ejecutan pruebas para determinar si existe diferencia significativa entre medias, varianzas de Y a diferentes niveles de X. Además los datos pueden ser mostrados gráficamente en varias maneras.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Aislamiento e identificación de levaduras

Las cepas aisladas se conservaron en agar Saboreaud extracto de malta a 6 °C durante 3 meses. Las cepas aisladas pertenecientes al género *Kluyveromyces sp* se rotularon para facilitar su identificación y fueron las siguientes:

Cepas	Género	Símbolo
I	<i>Kluyveromyces sp.</i>	Kc BA-IA-2009-I
II	<i>Kluyveromyces sp.</i>	Kc BA-IA-2009-II

Fuente: elaboración propia

El aislamiento de levaduras es importante porque permitió trabajar con cepa pura y así evaluar la contribución de la levadura en la definición de las características generales de la bebida fermentada.

El procedimiento del aislamiento e identificación de levaduras esta descrita en la sección 3.1. y 3.1.1. La adición de metabisulfito de sodio está relacionada con el pH del medio. El pH define el grado de disociación del metabisulfito de sodio y la fracción activa antimicrobiana está conformada por SO₂ libre desde que otra parte de esta reacciona con compuestos como azúcares e intermediarios del metabolismo de levaduras como piruvato. El metabisulfito de sodio es un agente inhibidor del



crecimiento y desarrollo de levaduras. Además Mc Ghee et al. (1982), menciona que se puede observar, que la adición de metabisulfito, disminuye el perfil fermentativo de levaduras.

Las cepas de levadura aisladas se utilizaron posteriormente en los ensayos de tolerancia a etanol, ácido acético y producción de etanol, conociendo sus habilidades de tolerancia y producción se seleccionó la más adecuada que es descrito posteriormente.

4.2. Identificación de cepas de levadura aisladas

Los resultados de la identificación de cepas de levadura corresponden a los resultados del estudio morfológico y fisiológico de levaduras.

4.2.1. Estudio morfológico de levaduras

Los resultados morfológicos de las colonias se presentan en la figura 02, donde se evaluó la textura, color, apariencia y forma de las colonias.

Las colonias presentaron forma elipsoidales a cilíndricos, formación individual y en pares e incluso formando cadenas cortas, las cuales presentaron Pseudomicelio, con respecto al color varió de crema a crema ligeramente marrón, aspecto brillante, algo extendido y chato, liso u ondulado. Resultados que asevera con las investigaciones de Peña, (1984). En la figura 02, se muestra las imágenes de las colonias de levadura aislada.

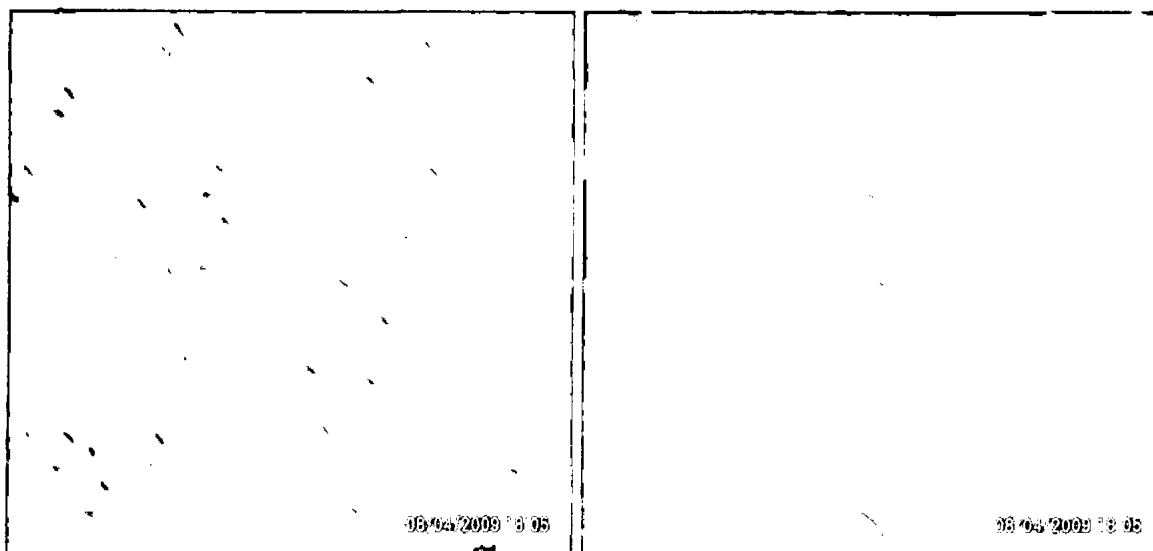


FIGURA 02: Morfología de las colonias de levaduras aisladas sobre agar Saboraud

4.2.2. Estudio fisiológico de levaduras

Los carbohidratos con que se realizó el estudio fisiológico fueron glucosa, galactosa, maltosa, almidón y lactosa; también la utilización y crecimiento en fuentes de nitrógeno. El estudio fisiológico de fermentación de azúcares se detalla en la sección 3.1.3.2, y los resultados obtenidos se muestra en la tabla 10.

Los resultados que se muestran en la tabla 10 de las dos cepas aisladas son capaces de fermentar glucosa, galactosa y lactosa, los resultados concuerdan con Lodder (1970), quien manifiesta que *Kluyveromyces fragilis* fermentan glucosa, galactosa y lactosa y no fermentan maltosa ni almidón respectivamente. Estos resultados son importantes ya que contribuyen a confirmar el género de las cepas aisladas (*Kluyveromyces*). Por otro lado, la fermentación de glucosa, galactosa y lactosa ayuda a predecir la performance que tendrán las cepas aisladas en la fermentación del mosto.

TABLA 10: Evaluación de la capacidad fermentativa de fuentes de carbono por levaduras aisladas

Fuentes de carbono	Cepas				Tiempo
	Kc BA-IA-2009-I		Kc BA-IA-2009-II		
	Formación de CO ₂	Formación de Film	Formación de CO ₂	Formación de Film	
Glucosa	++	+	++	+	24 Horas
Galactosa	++	+	+	+	
Maltosa	-	-	-	-	
Almidón	-	-	-	-	
Lactosa	++	+	++	+	
Glucosa	+++	++	+++	+	48 horas
Galactosa	++	+	++	+	
Maltosa	-	-	-	-	
Almidón	-	-	-	-	
Lactosa	+++	+	+++	+	

Fuente: elaboración propia

Donde:

- = Nulo + = Débil ++ = Moderado +++ = Intenso

La formación de película en la parte superior del medio de cultivo esta generalmente asociado al requerimiento de oxígeno por parte de las levaduras. Levaduras altamente reductoras tienden a formar gruesas capas de película. Las levaduras formadoras de película pertenecen comúnmente a los géneros *Kloeckera*, *Pichia*, *Hansenula* y algunas especies del genero *Saccharomyces* (Estela 2004).

Los resultados de la Tabla 10 muestran que a las 24 horas de fermentación existe una moderada producción de CO₂ y a las 48 horas una producción intensa en la cepa Kc BA-IA-2009-I, del mismo modo la cepa Kc BA-IA-2009-II, por lo cual desde el punto



de vista tecnológico es favorable, por otro lado se observa que la cepa Kc BA-IA-2009-I presento formación de película de manera débil a las 24 horas y moderada a las 48 horas, de manera distinta la cepa Kc BA-IA-2009-II que forma películas de manera débil a las 24 horas y 48 horas con la misma intensidad, estos resultados nos indican que requieren bajas concentraciones de oxígeno y tienen carácter reductor.

a). Estudio de tolerancia al etanol

Los resultados de la tolerancia al etanol se muestran en la tabla 11 y 12. y el procedimiento para los ensayos de tolerancia al etanol exógeno se describen en la sección 3.2.1. La tolerancia al etanol por levaduras está relacionado con la composición de los lípidos de su membrana celular. Las levaduras que toleran concentraciones altas de etanol son aquellas capaces de mantener la estabilidad de su membrana celular en el transcurso de la fermentación.

TABLA 11: Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por Kc BA-IA-2009-I

Reacciones durante la fermentación	% ETANOL				Tiempo
	2%	4%	6%	8%	
Formación de CO ₂	++	+++	-	-	24 horas
Formación de Film	+	+	-	-	
Precipitación	++	+	+	-	
Formación de espuma	++	+	-	-	
Formación de CO ₂	+++	+++	-	-	48 horas
Formación de Film	++	++	-	-	
Precipitación	++	+	+	-	
Formación de espuma	++	+	-	-	

Fuente: elaboración propia



La tolerancia al etanol se determinó indirectamente observando las diferentes características de fermentación a 24 horas y 48 horas. La formación de CO₂, formación de film, precipitación, turbidez y formación de espuma son indicadores de la capacidad que tienen las cepas aisladas para fermentar azúcares en presencia de una determinada concentración de etanol exógeno.

Los resultados de la tabla 11 muestran que la cepa Kc BA-IA-2009-I presentó formación de CO₂ de manera moderadamente con una concentración de 2% v/v de alcohol exógeno a las 24 horas y una fermentación intenso a las 48 horas, de la misma forma la precipitación y la formación de espuma a las 24 horas es moderado y a las 48 horas mantiene las mismas características, la formación de film es débil a las 24 horas y moderado a las 48 horas; Adicionado 4% v/v de etanol exógeno los resultados de la producción de CO₂ fue intenso a las 24 horas, manteniéndose con las mismas características a las 48 horas, la formación de film a las 24 horas tuvo una formación de manera débil, evaluado a los dos días los resultados de formación de film fue moderado, la precipitación y la formación de espuma de manera débil a las 24 horas y 48 horas; adicionado 6% v/v de alcohol endógeno no presentó producción de CO₂, formación de film ni formación de espuma, pero si se observó una turbidez y precipitación de manera débil a las 24 horas y manteniéndose con las mismas características a las 48 horas.

Los resultados obtenidos es muy importante de notar ya que indican que la cepa Kc BA-IA-2009-I no toleran concentraciones mayores o iguales a 6% de etanol;



adicionado 8% v/v no presentó ningunas de las características para poder afirmar que exista una posible tolerancia al alcohol endógeno a una concentración de 8% v/v.

TABLA 12: Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por Kc BA-IA-2009-II

Reacciones durante la fermentación	% ETANOL				Tiempo
	2%	4%	6%	8%	
Formación de CO ₂	++	++	+	-	24 horas
Formación de Film	+	-	-	-	
Precipitación	++	+	-	-	
Formación de espuma	++	-	-	-	
Formación de CO ₂	++	++	++	-	48 horas
Formación de Film	++	+	-	-	
Precipitación	++	++	+	+	
Formación de espuma	-	-	-	-	

Fuente: elaboración propia

Los resultados de la tabla 12 muestran que la cepa Kc BA-IA-2009-II presentó características similares a la cepa Kc BA-IA-2009-I considerando la diferencia de tolerar hasta 6% v/v de manera débil reportado a las 24 horas manteniéndose con las características a las 48 horas.

Estos resultados son favorables para nuestro propósito, da una idea que ambas cepas podrían utilizarse en la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero desde que el contenido alcohólico esperado de la bebida será de 3% v/v a 3.5%v/v.

Los resultados de tolerancia al etanol exógeno muestra un punto de partida para entender la capacidad fermentativa de las dos cepas y poder hacer una buena selección para el proceso de elaboración de la bebida fermentada de lactosuero.



Explicaciones sobre el efecto inhibitorio del etanol fueron discernidos por Alexandre *et al.*, (1994); Leao y Van Uden, (1980,1984) quien menciona que la fase tardía de la caída de la actividad fermentativa está caracterizado por un aumento sensible del etanol en el medio. El etanol influye sobre todo en esta parte de la fermentación perturbando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y disminuyendo su selectividad. Así mismo el etanol, alcoholes superiores adicionados durante la fermentación alcohólica ejercen un efecto menos tóxico que una inhibición endógena (Petrov y Okorokov, 1990)

b). Tolerancia al ácido acético

Las levaduras durante la fermentación de azúcares producen normalmente ácido acético, la producción de ácido acético por levaduras está relacionada principalmente con la naturaleza en sí de la cepa, la temperatura de fermentación y la composición del medio de fermentación como lo manifestado por Bellissimi y Ingledew, (2004).

Por otro lado el ácido acético es un producto inhibitorio y hasta tóxico para las levaduras a medida que se incrementa en concentración durante la fermentación alcohólica tal como lo menciona (Lafon *et. al.*, 1984). Los resultados de tolerancia del ácido acético exógeno se presentan en la Tablas 13.

TABLA 13: Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de la cepa Kc BA-IA-2009-I

Reacciones durante la fermentación	Concentración de ácido acético				Tiempo
	50ppm	100ppm	200ppm	500ppm	
Formación de CO ₂	++	++	++	-	24 horas
Formación de Film	+	+	+	+	
Precipitación	++	++	+	+	
Formación de espuma	+++	+++	+++	+	
Formación de CO ₂	++	+++	++	+	48 horas
Formación de Film	++	++	++	++	
Precipitación	++	++	++	+	
Formación de espuma	+++	+++	+++	++	

Fuente: elaboración propia

De los resultados mostrados en la tabla 13 se determinó la tolerancia del ácido acético exógeno por la cepa Kc BA-IA-2009-I que infieren que dicha cepa fermentaron moderadamente evaluados a las 24 horas, de la misma manera a las 48 horas con una adición de ácido acético de 50 mg/L; adicionado 100 mg/L de ácido acético exógeno la fermentación es moderado evaluado a las 24 horas e intenso a las 48 horas, adicionado 200mg/L la fermentación es moderado evaluado a las 24 horas, con las mismas características resultó evaluado a las 48 horas.

La cepa Kc BA-IA-2009-I no presento ninguna reacción de fermentabilidad cuando fue evaluado con una concentración de 500mg/L de ácido acético exógeno evaluado a las 24 horas, pero si evaluado a las 48 horas, fue capaz de tolerar el ácido acético de manera débil.



Los resultados obtenidos indican que la cepa Kc BA-IA-2009-I podría producir hasta 500mg/L de ácido acético ya que toleran estas concentraciones, sin embargo estos factores son controlable como lo manifestado por Bellissimi y Ingledew, (2004). Estos factores se consideraron en la elaboración de bebida fermentada a partir de lactosuero.

TABLA 14: Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de la cepa Kc BA-IA-2009-II

Reacciones durante la fermentación	Concentración de ácido acético				Tiempo
	50ppm	100ppm	200ppm	500ppm	
Formación de CO ₂	+++	++	++	+	24 horas
Formación de Film	++	++	++	++	
Precipitación	+	+	+	+	
Formación de espuma	+++	++	++	+	
Formación de CO ₂	+++	+++	++	+	48 horas
Formación de Film	++	++	++	++	
Precipitación	++	++	++	++	
Formación de espuma	++	++	+	++	

Fuente: elaboración propia

Los resultados de la Tabla 14 muestran que la cepa Kc BA-IA-2009-II a diferencia de la cepa Kc BA-IA-2009-I, presenta una formación de CO₂ de manera intensa evaluado a las 24 horas con las mismas características a las 48 horas adicionado ácido acético con una concentración de 50mg/L, por otro lado la cepa Kc BA-IA-2009-II presenta resultados de fermentabilidad de manera débil a las 24 horas y 48 horas adicionado 500mg/L de ácido acético. La evaluación de la tolerancia al ácido acético exógeno por las dos cepas seleccionadas se evaluó indirectamente teniendo en consideración la producción de CO₂ del medio de fermentación.



c). Estudio de producción de etanol

Las levaduras producen etanol a condiciones anaerobias en presencia de azúcares fermentables. La principal limitación de este proceso son las bajas concentraciones de etanol que se obtiene por la intolerancia de algunas cepas y bajas concentraciones de lactosa en el lactosuero que genera entre 2.5% v/v a 3.5% v/v de etanol al final de la fermentación. Desde un principio se ha explorado la utilización de suero concentrado para obtener una mayor concentración de etanol en la bebida fermentada, para ello debe obtener cepas tolerantes a concentración altas de etanol y a la osmolaridad del medio, esta aseveración se confirma con los resultados encontrados por Garibay et. al., (1993). Los ensayos de producción de etanol se detallan en la sección 3.3. y los resultados se muestran en la Tabla 15 y en la figura 03 y 04 respectivamente.

TABLA 15: Producción de etanol y acidez por las cepas Kc BA-IA-2009-I y Kc BA-IA-2009-II, durante la fermentación del mosto de lactosuero

Tiempo (Hrs)	Etanol (ml/L)		CO ₂ (g/L.)		pH	
	Kc BA-IA-2009-I	Kc BA-IA-2009-II	Kc BA-IA-2009-I	Kc BA-IA-2009-II	Kc BA-IA-2009-I	Kc BA-IA-2009-II
0	0	0	0	0	5.6	5.6
12	1.8	1.9	3	4	5.4	5.51
24	8	8.2	9	14	5.1	5.12
36	15.3	17.1	18	26	4.7	4.68
48	21.3	22.3	26	30	4.6	4.53
60	25.3	25.7	29	32	4.5	4.43
72	27.2	28.3	32	34	4.4	4.39
84	29.4	30.7	33	35	4.3	4.38
96	30	31.6	33	35	4.3	4.37

Fuente: elaboración propia



Los resultados de la Tabla 15 muestran la producción de etanol, CO₂ y pH de las dos cepas aisladas. Se observa que la cepa Kc BA-IA-2009-II presenta mayor cantidad de etanol (31.6 ml/L) en un tiempo de 96 horas de fermentación comparada con la cepa Kc BA-IA-2009-I que presenta menor cantidad de etanol (30 ml/L), es decir que ambas cepas fueron capaces de degradar la lactosa y obtener el porcentaje de etanol esperado.

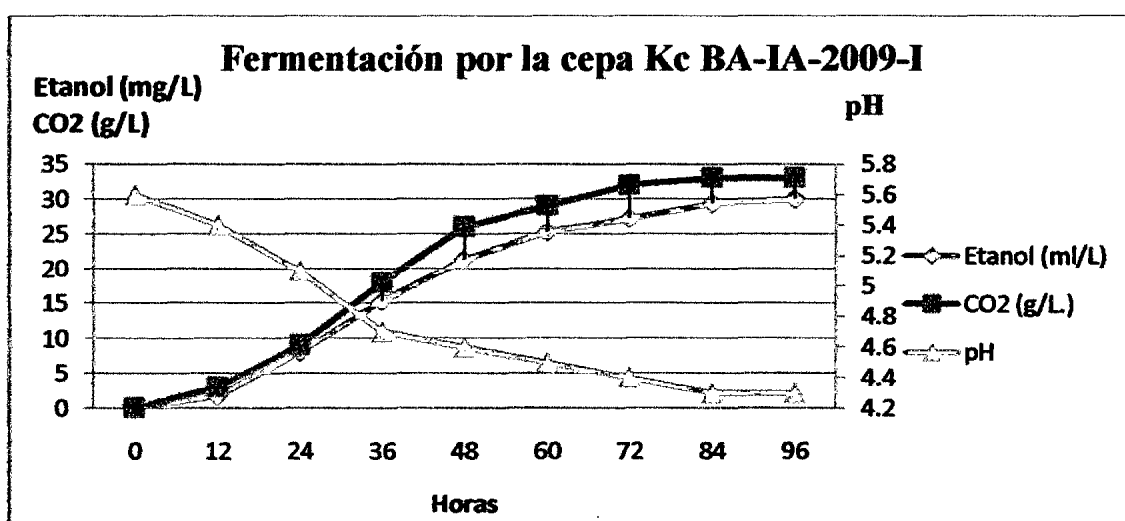


FIGURA 03: Transcurso de la fermentación con la cepa Kc BA-IA-2009-I en mosto de suero a 20±1°C

En la figura 03 muestra los resultados obtenidos del proceso de fermentación de la cepa Kc BA-IA-2009-I. Para comprobar la capacidad de fermentación de la cepa aislada se midió indirectamente la producción de CO₂. La producción de CO₂ puede controlarse indirectamente, midiendo la pérdida en peso del medio de fermentación; mediante esta técnica se obtuvo la tasa de producción de CO₂ y así saber en qué momento la fermentación ha concluido. La fermentación conduce a la producción de etanol, CO₂, glicerol, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, esterés, componentes azufrados y otros compuestos trazas.

En los resultados se puede observar que la fermentación concluyó en un tiempo de 96 horas cuando los valores de peso en CO₂ fueron constantes, indirectamente producción de etanol y aseverado con la determinación de etanol por el método pignométrico, acidez y pH valores que permanecen constante afirmamos una vez más que la fermentación ha concluido.

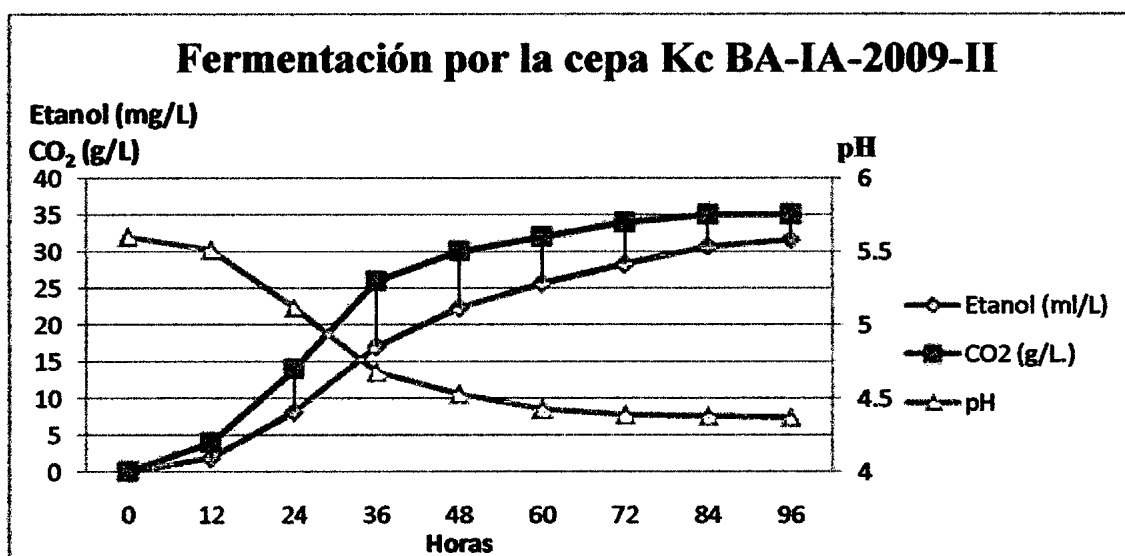


FIGURA 04: Transcurso de la fermentación con la cepa Kc BA-IA-2009-II en mosto de suero

La figura 04 muestra las curvas de crecimiento promedio de la cepa Kc BA-IA-2009-II, se puede distinguir la fase de adaptación de los microorganismos al medio, también se observa el momento en que llega a la fase estacionario donde existen variaciones mínimas. A partir de las curvas de crecimiento, es posible observar que la fase de adaptación fue ligeramente extensa para la cepa Kc BA-IA-2009-I que la cepa Kc BA-IA-2009-II. La modificación del sistema enzimático para iniciar la síntesis de enzimas (Shuler y Kargi, 1992) pudo causar que se extienda la fase de adaptación de la cepa Kc BA-IA-2009-I.

En el caso de la cepa Kc BA-IA-2009-I (figura 03), requiere un tiempo de fermentación mayor puede deberse a características propias de esta cepa. Es un sistema de producción por lote, un tiempo de fermentación más prolongada implica un proceso de producción más extenso y como consecuencia con mayores costos de producción que la otra cepa (Stanbury y Witaker, 1987).

Los resultados de la figura 04 muestra el tiempo de fermentación expresado gráficamente con la curva de crecimiento del proceso de fermentación de la cepa Kc BA-IA-2009-II, donde la producción de etanol alcanza (31.6 ml/L) a las 96 horas.

Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación contribuyen a conocer el comportamiento fermentativo de las cepas aisladas y seleccionar aquella que es la más adecuada para el proceso de fermentación de la bebida a partir de lactosuero.

4.3. Elaboración de la bebida fermentada de lactosuero

Las investigaciones realizadas previas a esta parte de la investigación son importantes y complementarias que fueron necesarias realizar por que permitió trabajar con una cepa de levadura aislada de nichos naturales. Los resultados obtenidos en las pruebas preliminares nos muestran que la cepa Kc BA-IA-2009-I presenta menor producción de etanol (30ml/L) en la bebida fermentada en comparación con la cepa Kc BA-IA-2009-II que fue ligeramente mayor alcanzando 31.6ml/L, esto quiere decir que ambas cepas fueron capaces de degradar el mayor porcentaje de los carbohidratos fermentables en etanol y tomando en consideración los factores que influyen en la



elaboración de la bebida fermentada se ha seleccionado la cepa Kc BA-IA-2009-II por las siguientes razones:

- Habilidad de tolerar etanol en concentraciones de hasta 6.0v/v%
- Formación de película relativamente débil, por consiguiente requerimiento de oxígeno menor.
- Habilidad de tolerar ácido acético en concentraciones de 500mg/L.

4.4. Preparación del suero para la fermentación

La elaboración de la bebida fermentada de lactosuero comienza con el acondicionamiento del lactosuero, cuyo proceso se detalla en la sección 3.3.1.

Para el acondicionamiento del suero, fue necesaria la desproteínización. El proceso de desproteínización se realizó tomando en cuenta los procesos estándares utilizados en la desproteínización del suero manifestado por Peña, (1984); Ferrari et. al., (1994). En la desproteínización se utilizó los siguientes tratamientos térmicos: 90°C y 100°C, por 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos, respectivamente. Además se realizó la esterilización como tratamiento térmico (121°C por 15 minutos), después de regular el pH a 4.5 con ácido cítrico. Estos tratamientos se realizaron como pruebas preliminares, comparando los tratamientos térmicos de desproteínización, se optó por el lactosuero tratado a 121°C por un tiempo de 15 minutos en el primer tratamiento térmico que sirvió para retirar la mayor cantidad de restos de proteína, caseína, grasa y minerales, este tratamiento térmico presentó mayor cantidad de sedimentación de la proteína y

menor turbidez. Establecido el tratamiento térmico de 121°C por 15 minutos el más adecuado, se procedió a separar los residuos de proteína por la técnica de sedimentación y posterior filtrado.

El criterio de elección del tratamiento térmico óptimo dependió del color final del lactosuero que fue agradable a la vista. Estos resultados corroboran con los resultados encontrados por Freire, (1997), quien aplicó 115°C por un tiempo de 15 minutos, para la remoción de proteínas del suero para producir oligonucleótidos y oligosacáridos. Por otro lado se han reportado temperaturas de desproteinización de suero de 93°C a 95°C por tiempos de 30 minutos para la elaboración de bebidas en base a concentrados proteicos (Zhidkov et. al., 1981).

En cuanto al contenido de lípidos, una vez extraída la proteína por precipitación y posterior filtrado, estos se encuentran entre 0.1% y 0.2%, puesto que junto con la precipitación de proteína, parte de los lípidos quedan atrapados en la estructura del precipitado como menciona Artavia (1990).

Los resultados con respecto a la cantidad de proteína residual en el suero puede deberse, a la diferencia en la composición enzimática de cada tipo de cuajo. El cuajo enzimático de origen animal, está elaborado a partir del estómago de terneros o bovinos adultos, las enzimas activas del producto son la quimosina y pepsina. De otro lado, los tipos de cuajos empleados, se diferencian por su rendimiento con respecto a

la actividad proteolítica, la inestabilidad al calor, la sensibilidad a cambios de pH, la temperatura y el CaCl_2 (Janssens, et. al., 1984).

Una vez que se ha obtenido el lactosuero desproteínizado se procedió a la elaboración de la bebida fermentada a partir de lactosuero. El proceso de producción de la bebida se describe en detalle en la sección 3.3.2. Para la fermentación se utilizó un biorreactor como se muestra en la figura 05.

Al término de la fermentación se obtuvo una bebida fermentada de lactosuero.

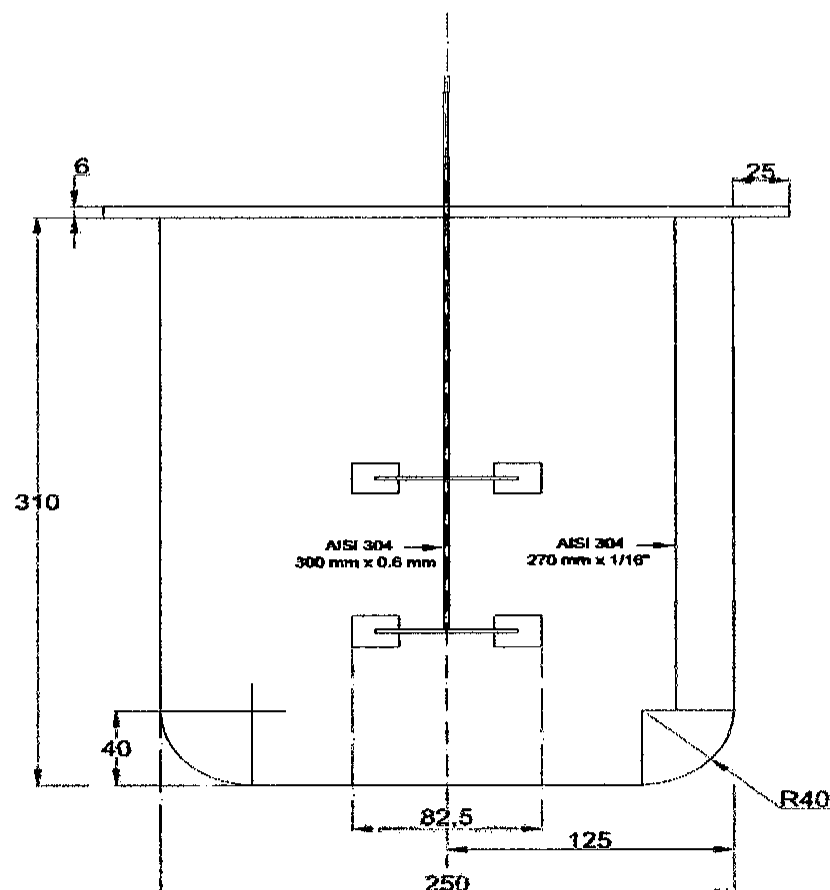


FIGURA 05: Biorreactor utilizado durante la fermentación del lactosuero

Una vez obtenida la bebida de lactosuero se realizaron los análisis de control de calidad, los análisis incluyeron; análisis fisicoquímico, nutricional y sensorial.

4.4.1. Análisis de composición fisicoquímica de la bebida de lactosuero

Los análisis fisicoquímicos comprendieron el contenido de etanol, acidez y densidad, los resultados se muestran gráficamente en cada análisis.

Con respecto al contenido del etanol de la bebida de lactosuero los valores obtenidos se muestran en la figura 06.

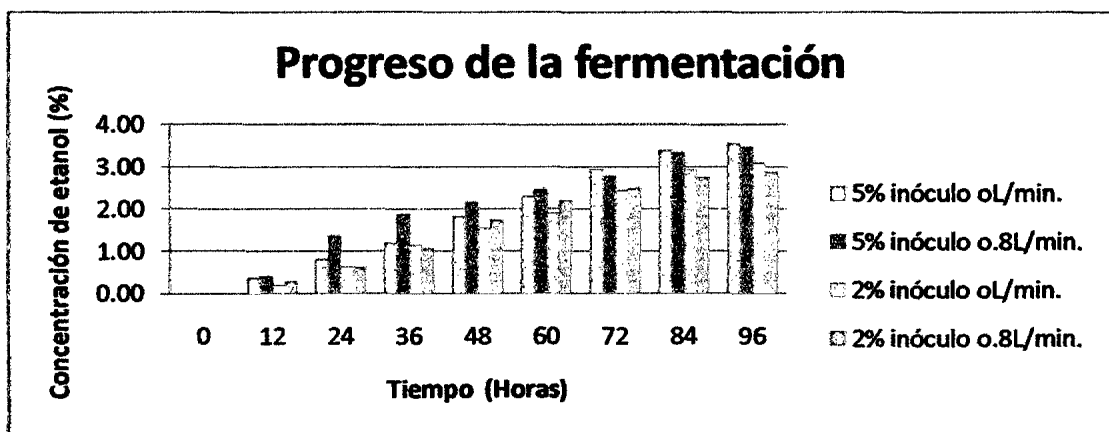


FIGURA 06: progreso de la producción de etanol durante la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero

En la figura 06, se encuentran expresados los resultados de la evaluación de la cinética de fermentación con dos concentraciones de inóculo (5% y 2%) con y sin aireación (0.8L/minuto y 0L/minuto), para la producción de la bebida alcohólica de lactosuero.



Donde:

Tratamiento 1 = 2% de inóculo y 0L/minuto

Tratamiento 2 = 2% de inóculo y 0.8L/minuto

Tratamiento 3 = 5% de inóculo y 0L/minuto

Tratamiento 4 = 5% de inóculo y 0.8L/minuto

Se observa que para cada tratamiento tiene una cinética de fermentación diferente, los resultados encontrados muestra un máximo contenido de etanol (3.55%), que le correspondió al tratamiento 3 (5% de inóculo y 0L/min de aireación), por otro lado el contenido mínimo de etanol fue de 2.87% trabajado con una concentración de inóculo de 2% y 0.8L/min de aireación. Se puede afirmar que a mayor concentración de inóculo la producción de etanol fue mayor, esta aseveración significaría que a menor concentración de inóculo exista una población microbiana menor, incapaz de fermentar todos los carbohidratos fermentables para la conversión a etanol, del mismo modo a concentraciones de 2% de inóculo (tratamiento 1 y tratamiento 2) la producción de etanol es en promedio 2.98% con y sin aireación, resultados relativamente bajo comparando con la adición de 5% de inóculo (tratamiento 3 y tratamiento 4), este valor es corroborado con lo mencionado por Marcht, (1973) quien manifiesta que el bajo contenido de lactosa, impide alcanzar concentraciones superiores al 3.5% de alcohol, a menos que el producto sea fortificado. El resultado muestra que existe una relación directa entre la concentración inicial de la lactosa y la cantidad de etanol producido, lo que concuerda con lo reportado por Gough y Flynn (1996), quienes observaron que un incremento en la concentración de carbohidratos

para la fermentación con la levadura, tiene un efecto negativo en la cantidad final de etanol obtenido. La cantidad de azúcar que se convierte en etanol dependerá de la capacidad de las levaduras, de los nutrientes y de la concentración de alcohol que pueda tolerar la levadura sin que se detenga la fermentación (Ouhg, 1996; Jagnow y Dawid, 1991).

El pH de la bebida fermentada al inicio de la fermentación (0 hora) inicia con 5.6 tal como se muestra en la figura 07.

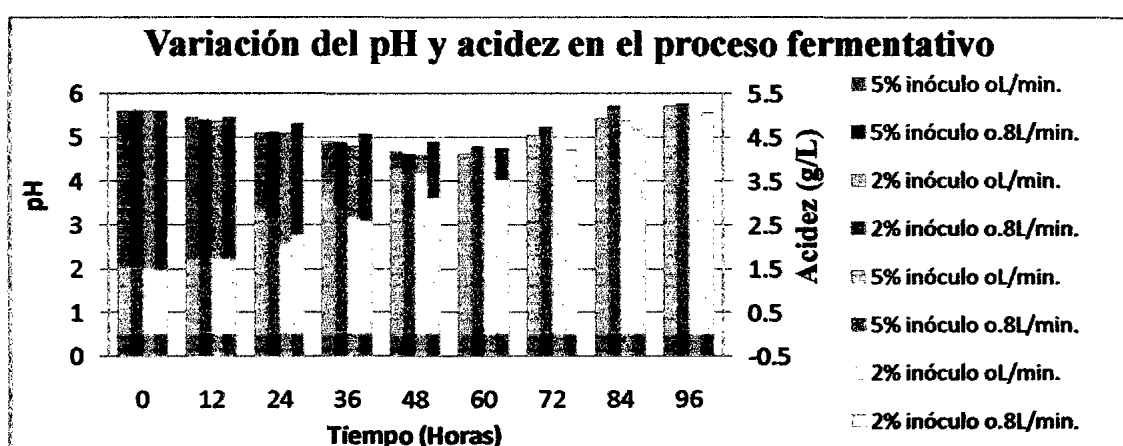


FIGURA 07: progreso de la variación del pH y acidez durante la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero.

El suero se ajustó el pH a 5.6 para iniciar la fermentación, con la finalidad de permitir la fermentación de las levaduras, al finalizar la fermentación que tomó alrededor de cuatro días (96 horas), el pH de las bebida fermentada fluctuaba entre 4.20 a 4.34 esto nos indica que sí existió la producción de ácido láctico ya que se redujo el valor del pH en las 96 horas, el tratamiento con mayor acidez (0.53 g/L.) fue el de 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación que le correspondió al tratamiento 3, alcanzando un



pH final de 4.20 y el tratamiento con menor acidez (0.50g/L.) fue el de 2% de inóculo y 0.8L/minuto de aireación (tratamiento 2) alcanzando un pH final de 4.34, lo que indica que existe poca variación de pH evaluado con los diferentes tratamientos en la producción de la bebida fermentada de lactosuero, por consiguiente señalamos que la acidez es una medida de la cantidad de ácido láctico producido en la bebida durante la fermentación. Por otro lado Athanasiadis et. al, (2004), manifiesta que el pH es un factor importante que puede afectar grandemente la calidad de la bebida durante el proceso de fermentación. En un trabajo realizado por Athanasiadis demostró que el pH final de la bebida está relacionado con el tiempo de fermentación de los azúcares, los niveles de dióxido de carbono y los compuestos volátiles formados durante la fermentación de la bebida fermentada (Athanasiadis, et. al, 2004). Así mismo se encontró la relación inversa entre el valor del pH y la acidez, este resultado corrobora con los resultados encontrados por Walstra, (1999), quien manifiesta que la acidez y el pH exhiben una correlación débil. Pero cuando inicia la producción de ácido, la acidez aumenta proporcionalmente, mientras que el pH disminuye. Esto se debe a la fermentación láctica propiciada por las levaduras presentes durante la elaboración de las bebidas fermentadas.

Con respecto al contenido de la densidad de la bebida fermentada de lactosuero es otro parámetro que determina la calidad, la densidad final de la bebida fluctuó entre los valores de 1.0280g/L y 1.0285g/L, como se muestra en la figura 08.



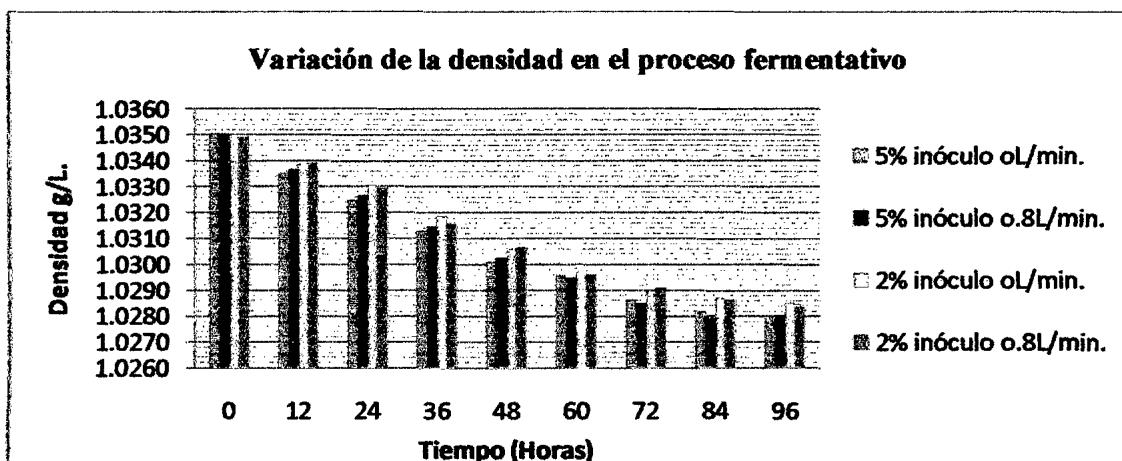


FIGURA 08: proceso de la variación de la densidad durante la producción de la bebida fermentada a partir de lactosuero.

La densidad con que se inició la fermentación fluctuó entre los valores de 1.0351g/L y 1.0349g/L (figura 08), de los resultados mostrados se deduce que a mayor concentración de inóculo (5%v/v) existió una tasa mayor de utilización de azúcares, indirectamente medido la cantidad de etanol producido.

4.4.2. Análisis de composición nutricional de la bebida de lactosuero

Los análisis de la composición nutricional de la bebida comprendieron, el contenido de proteína y lactosa.

En la figura 09 se muestra los resultados obtenidos del análisis de la proteína y fue necesario realizar una comparación de los resultados obtenidos del lactosuero y de la bebida fermentada. El resultado máximo del contenido de proteína del lactosuero fue de 0.87g/L trabajado con el tratamiento 2 (2% de inóculo y 0.8L/minuto), mientras que el valor mínimo lo obtuvo el tratamiento 3 (5% de inóculo y 0L/minuto), cuyo valor

fue de 0.82g/L. Realizando un promedio de las medias de los cuatro tratamientos el contenido de proteína fue de 0.84g/L. (figura 09), también se detalla los valores obtenidos del contenido de proteína de la bebida de lactosuero, donde los valores oscilan entre 0.47g/L. a 0.49g/L.

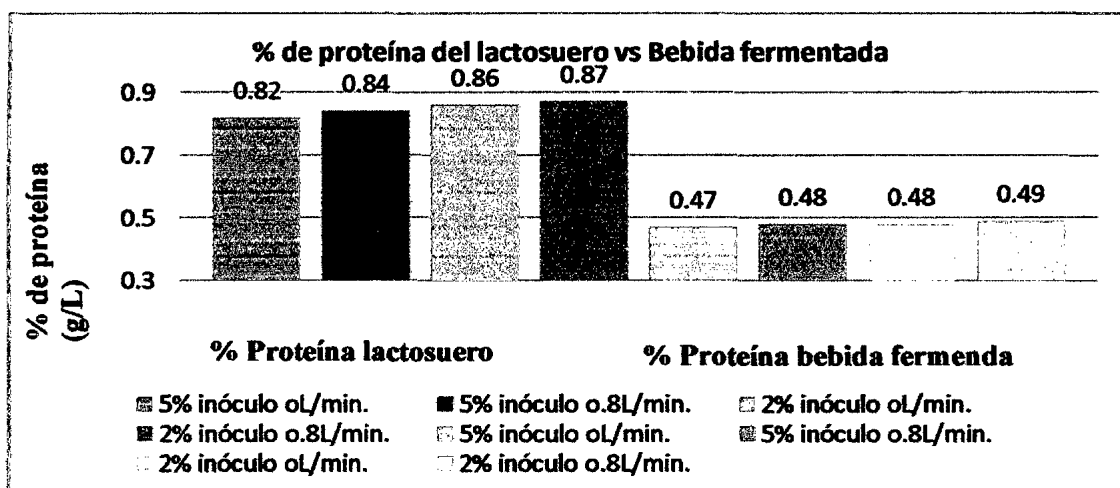


FIGURA 09: contenido de proteína del suero desproteínizado y la bebida fermentada

El contenido de proteína en la bebida está directamente relacionado por la cantidad de proteína presente en el suero, de acuerdo a los resultados obtenidos el suero utilizado en el proceso fermentativo presentó contenido de 0.84g/L de proteína, este resultado se debería a la influencia de la raza del ganado, alimentación, procedencia entre otros factores que influye en la cantidad nutricional del suero. Sin embargo, el proceso fermentativo no mostró inconvenientes debido a la desproteínización del lactosuero. Por otro lado, los constituyentes nitrogenados influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales de la bebida fermentada.

En la figura anterior también muestra que la bebida tuvo en promedio 0.48 g/L de proteína, resultado bastante bajo que se debería al desproteínizado que se realizó al suero antes del proceso fermentativo. Los resultados encontrados se asemejan con la investigación de Itara, (1997), en su investigación elaboró una bebida fermentada a partir de un suero ácido adicionado en diferentes proporciones de leche, lo cual obtuvo 0.71g/L de proteína al fermentar lactosuero sin adición de leche. Resultado que se asemejan con la investigación, el margen de diferencia se debería a la no desproteínización del suero a fermentar.

El contenido de proteína de fue de 1.35g/L., esta diferencia se debería por que realizó una combinación de suero y leche para la elaboración de una bebida como alternativa al suero lácteo. Del mismo modo resultados obtenidos por Rose, (1997) en su investigación utiliza el suero sin suplementar el mosto con el objetivo de evaluar el desarrollo de las levaduras en el mosto de suero que contiene medio simple y sin la necesidad de enmascarar los resultados de la proteína y de otros compuestos nutricionales.

En la figura 10, se muestra el diagrama de Pareto que expresa el grado de significancia de las variables fijas con respecto a la proteína.

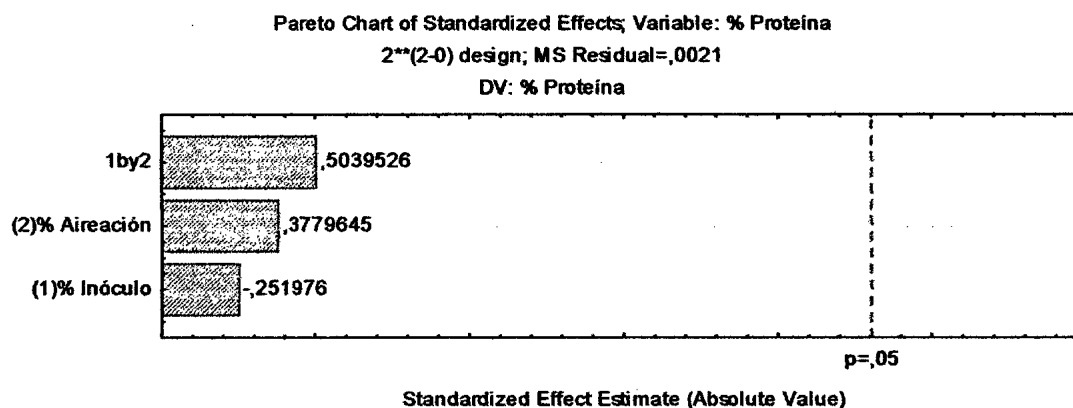


FIGURA 10: Diagrama de Pareto estandarizado para la proteína

Este resultado que se muestra en el diagrama de Pareto era de esperarse, puesto que el lactosuero fue desproteínizado antes de iniciar el proceso fermentativo lo cual afirma que las variables fijas no influyen sobre el contenido de proteína.

De igual manera, el contenido de lactosa para la bebida osciló entre 3.21g/L a 3.32g/L, como se muestra en la figura 11. La lactosa representó una concentración adecuada para el crecimiento de las levaduras, según resultados de diversas investigaciones en la que utilizaron el suero como medio fermentativo como menciona Chinappi y Sánchez (2000); Quinteros et. al., (2001); Ghaly y Kamal (2004). El nivel de azúcar presente es una de las razones que convierte al suero en un sustrato óptimo para procesos fermentativos.



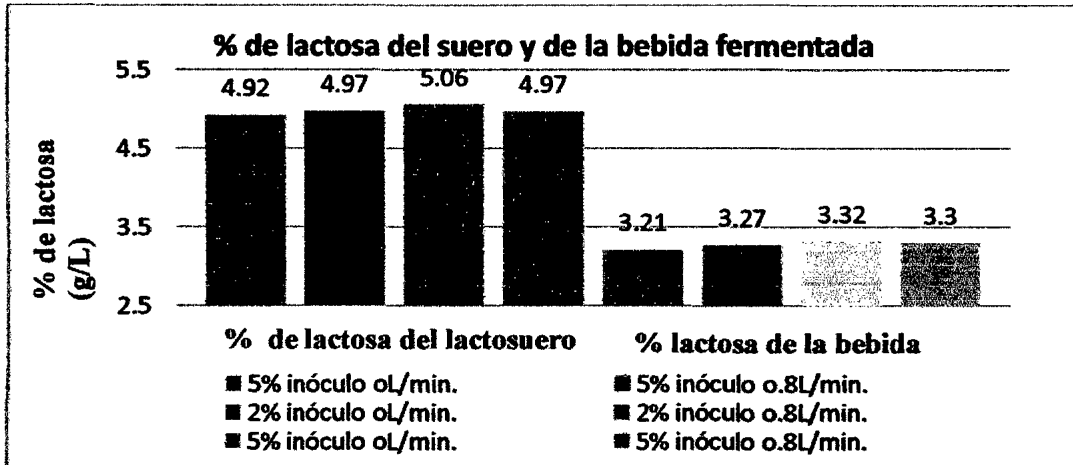


FIGURA 11: contenido de lactosa del suero desproteinizado y la bebida fermentada

Analizando los datos, se puede observar una disminución en el contenido de lactosa, esto debido a la degradación de la lactosa para la conversión en etanol, tal como lo menciona Bremond, (1966) para producir un litro de alcohol será necesario 1,640g de lactosa, de otra forma se dice que 16.4g/L corresponde a un grado alcohol, es por esta razón que en el proceso fermentativo se obtuvo un máximo de 3.5% de etanol. En la figura 12, se muestra el diagrama de Pareto que expresa el grado de significancia de las variables fijas con respecto a la lactosa.

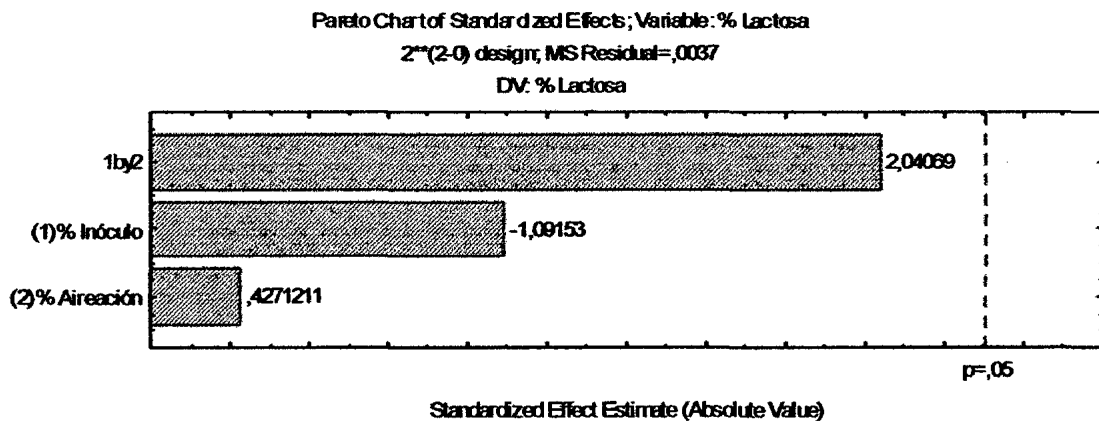


FIGURA 12: Diagrama de Pareto estandarizado para la lactosa

4.4.3. Análisis sensorial de la bebida de lactosuero

Antes de realizar los análisis sensoriales definitivos de la bebida, se ha realizado el entrenamiento preliminar de los jueces. El análisis sensorial fue nuestro instrumento de medición que constituyó las personas que evaluaron la bebida, después de ser seleccionados y haberse comprobados el adiestramiento.

4.4.3.1. Sabor y aroma de la bebida de lactosuero

Para un buen análisis sensorial de la bebida e identificar el sabor y aroma, los sentidos clásicos son el olfato, gusto, vista y tacto. Son diversos los criterios reportados en la literatura con relación al peso e importancia de cada una de las propiedades sensoriales en la calidad y aceptación de la bebida.

Los principales atributos que se evaluaron fueron; amargos, metálicos, alcohólicos, a suero, levadura, diacetilo, acetaldehído y acidez, estos atributos determinan características sensoriales negativas o positivas cuando el grado de percepción son muy alto o bajos. El procedimiento para realizar la evaluación sensorial se describe en detalle en la sección 3.3.4.2. Las evaluaciones han sido realizadas por un panel conformado por cinco jueces y el promedio de los resultados de sus apreciaciones se muestran en la tabla 16.



TABLA 16: Promedio de puntuaciones obtenidas durante la evaluación sensorial de sabor y aroma en la bebida fermentada de lactosuero

Atributos	2%v/v	5%v/v	2%v/v	5%v/v
	0L/minuto	0L/minuto	0.8L/minuto	0.8L/minuto
	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5
Color	2.04	1.51	1.87	1.73
Amargo	0.39	0.42	0.33	0.38
Metálico	0.23	0.27	0.18	0.26
Alcohólico	1.15	1.63	1.55	1.46
Suero	1.25	1.17	1.25	1.00
Levadura	0.42	0.52	0.41	0.46
Diacetilo	0.28	0.35	0.38	0.35
Acetaldehído	0.37	0.34	0.45	0.35
Acidez	1.10	1.82	1.51	1.16

Fuente: elaboración propia

El sabor amargo en la bebida fermentada alcanza valores que fluctúan entre 0.33 a 0.42 (figura 13), valores relativamente bajos ya que fue de esperarse resultados como este puesto que la bebida no presenta el atributo amargor significativamente como se muestra en el diagrama de Pareto que se muestra en la figura 14.

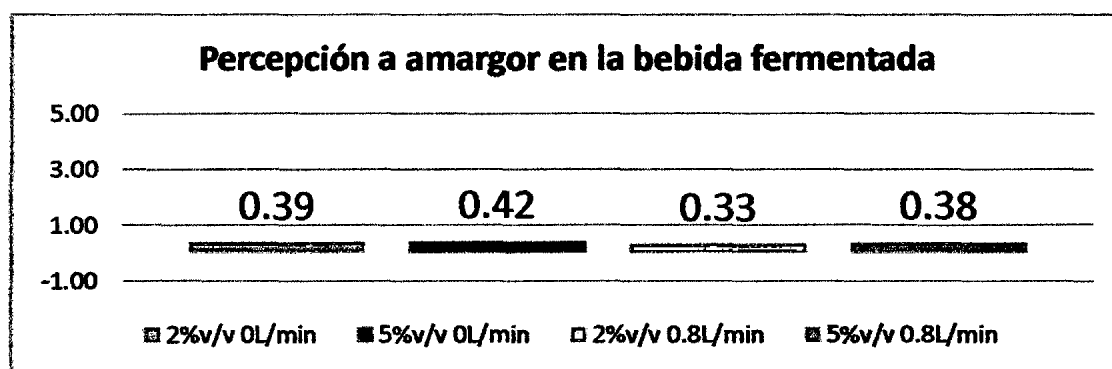


FIGURA 13: Grado de concentración del amargor en la bebida

Las variables fijas no presentan grado de significancia con respecto al atributo amargo. Por otro lado los diferentes tratamientos tampoco presentan diferencia significativa.

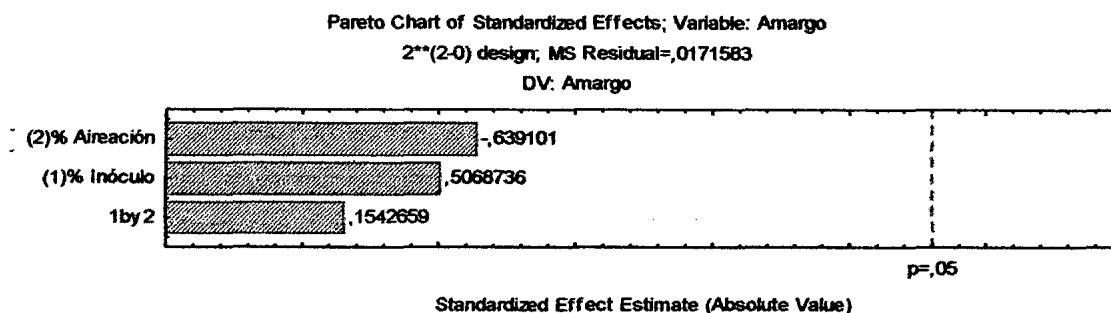


FIGURA 14: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo amargo

Con respecto a la percepción del atributo metálico los resultados son muy bajos que oscilan de 0.1 a 0.27. Estas características no serian de importancia significativa en la calidad sensorial de la bebida de lactosuero como se muestra en la figura 15.

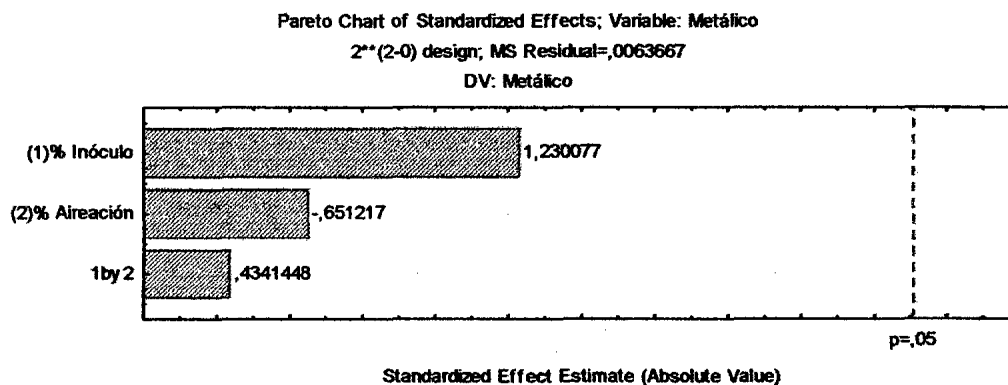


FIGURA 15: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo metálico

El resultado que se muestra en la figura 15, nos indica que la concentración del inóculo y concentración de aireación no influiría en la percepción del atributo metálico.

Por otro lado el atributo alcohólico está directamente relacionado con la concentración de etanol en la bebida producida por las levaduras. El resultado máximo obtenido fue de 1.63 trabajado con el tratamiento de 5% de inóculo y 0L/min de aireación, del mismo modo el valor inferior fue de 1.15 con el tratamiento de 2% y 0L/min de aireación medida con una escala de 0 a 5 como se muestra en el tabla 16 y figura 16.

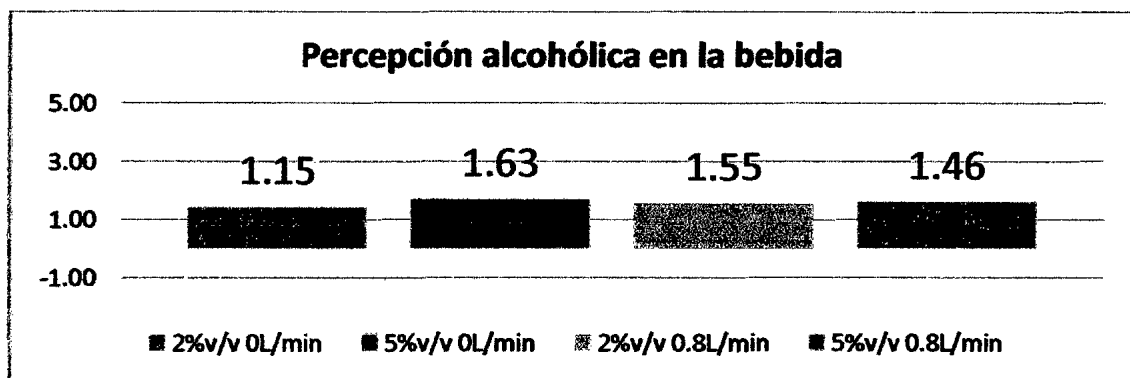


FIGURA 16: Grado de percepción alcohólico en la bebida
Es necesario señalar, la percepción alcohólica de la bebida aumenta a medida que la concentración del inóculo aumenta.

En la figura 17 se puede apreciar el grado de significancia que presenta la interrelación que existe entre el % de inóculo y % de aireación.

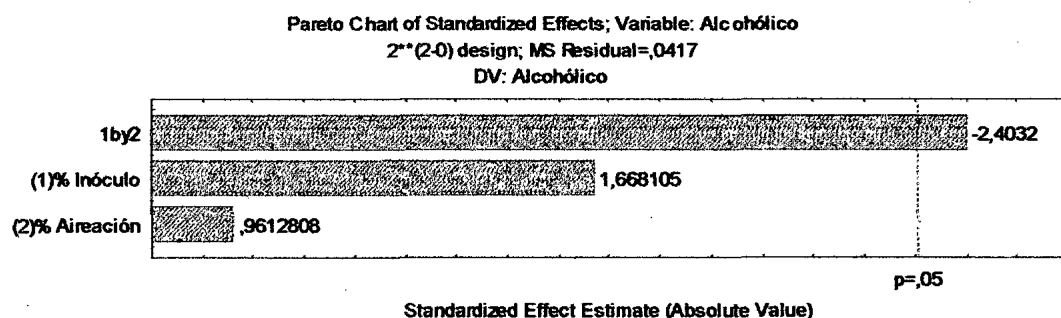


FIGURA 17: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo alcohólico

Esperado este resultado de significancia de ambas variables frente al atributo alcohólico, fue necesario realizar los análisis significativos de los tratamientos para determinar la significancia entre ellos; para ello se realizó el tratamiento estadístico de análisis de medias con el método de Duncan. Los resultados se reportan en la tabla 17.

TABLA 17: Grado de significancia entre tratamientos

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	1.1533
4	3	1.4633
2	3	1.5500
3	3	
Sig.		0.0518

El método Duncan muestra como mejor tratamiento a 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación, con grado de significancia de 0.0518 entre tratamientos.

El sabor a suero en la bebida es típico de este producto como podemos apreciar en el cuadro 16, los valores de la percepción alcanzaron valores superiores a uno en una escala de medición de cero a cinco, también podemos notar el grado de significancia que presenta el % de inóculo con respecto al atributo suero, como se muestra en la figura 18.

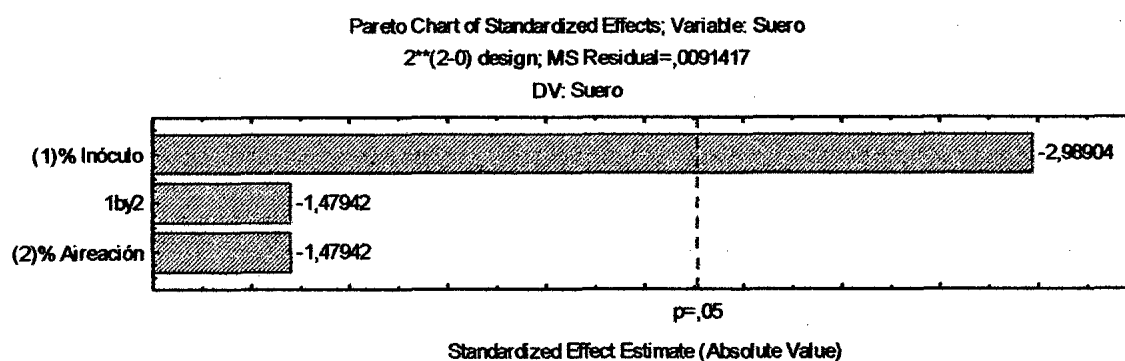


FIGURA 18: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo suero

La variable inóculo es significativo, puesto que a mayor concentración de inóculo existirá mayor consumo de azúcares fermentables en menor tiempo y el atributo a suero será menos. Fue necesario e importante realizar la prueba de Duncan, los resultados de la significancia entre tratamientos se muestran en la tabla 18.

TABLA 18: Grado de significancia de los tratamientos con respecto al Sabor a suero

Tratamientos	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	3	1.0033	
3	3	1.1667	1.1667
1	3		1.2500
2	3		1.2500
Sig.		0.0700	0.3360

El cuadro de Duncan reportó como mejor tratamiento a 5% de inóculo y 0.8L/minuto de aireación que le corresponde al tratamiento 4, por otro lado es necesario mencionar que existe diferencia significativa entre tratamientos, considerando el primer grupo al tratamiento 4 y 3 con una significancia de 0.0700 y el otro grupo los tratamientos 1 y 2 con una diferencia de 0.3360 como se muestra en la tabla 18.

El sabor a levadura es otra de las características que se tomó en cuenta para el análisis sensorial de la bebida de lactosuero que está relacionado con la cantidad de inóculo utilizado durante la fermentación tal como se muestra en la figura 19. El valor máximo fue de 0.52 de una escala de 0 a 5 con el tratamiento de 5% de inóculo y 0.8L/min de aireación, mientras que el valor mínimo lo obtuvo el tratamiento de 2% de inóculo con 0.8L/min de aireación obteniendo el valor de 0.41 de una escala de 0 a 5. Los



resultados de la figura 19 muestran que la percepción a levadura en la bebida aumenta a medida que la concentración de inóculo aumenta, no obstante los valores obtenidos son relativamente bajos, quiere decir que no influyen significativamente en el perfil sensorial global de la bebida, tal como se muestra en la figura 19 y figura 20 respectivamente.

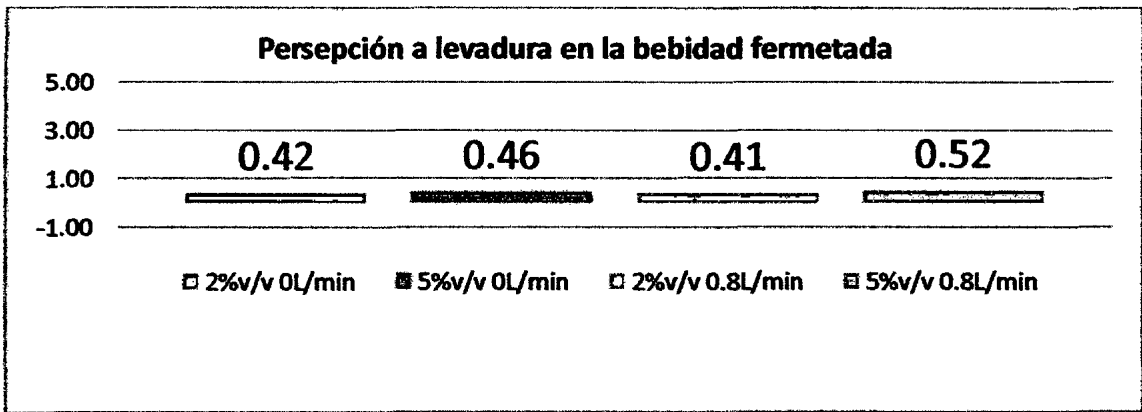


FIGURA 19: Grado de concentración de la levadura en la bebida

El resultado que se muestra en la figura 20, nos indica que la concentración de inóculo y aireación no influyen significativamente en la percepción a levadura en la bebida de lactosuero.

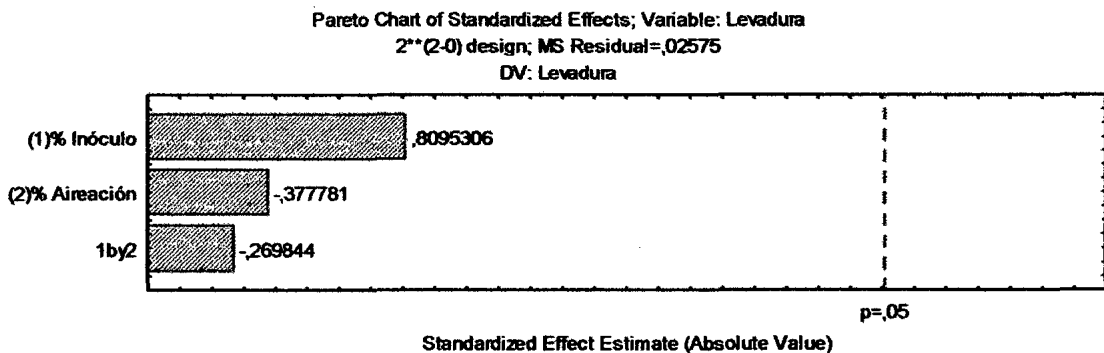


FIGURA 20: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo levadura

El acetaldehído y diacetilo son componentes producidos durante la fermentación, que contribuyen sensorialmente en la bebida fermentada. Datos recientes han probado que el acetaldehído se acumula en el interior de la célula durante la fermentación alcohólica en unas concentraciones de orden de diez veces la concentración observada en el medio exterior. Generalmente están presentes en concentraciones muy bajas, debajo de su valor de percepción. Concentraciones que excedan grandemente a su valor de percepción contribuyen negativamente al valor sensorial de la bebida fermentada. De manera similar, Stanley y Pamment, (1993), menciona que el efecto tóxico correspondiente no se ha podido demostrar todavía pero podría ser variable de una cepa a otra. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones complementarias para determinar cuantitativamente estos componentes y su interrelación con otros componentes en la bebida fermentada.

Los atributos a diacetilo y acetaldehído no son significativos en la calidad sensorial de la bebida de lactosuero, tal como se muestra en la figura 21 y figura 22 respectivamente.

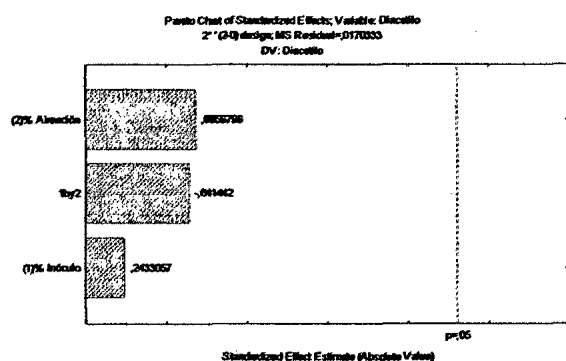


FIGURA 21: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo diacetilo

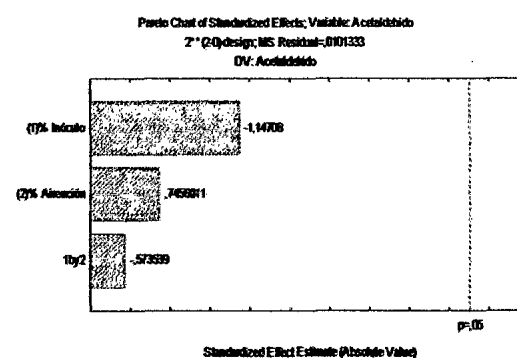


FIGURA 22: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo acetaldehído

Por último la percepción de la acidez en la bebida durante la fermentación se forma los ácidos orgánicos. Estos ácidos orgánicos pueden tener un efecto directo sobre las características organolépticas de la bebida fermentada, e intervenir en el valor del pH de la bebida. Tal como lo menciona Oura, (1977). Entre los ácidos orgánicos, el succinato representa, como el glicerol, uno de los sub productos mayoritarios de la fermentación.

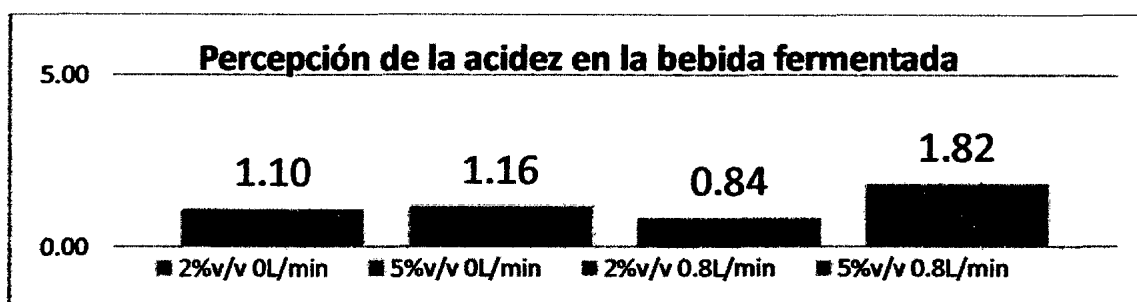


FIGURA 23: percepción de la acidez en la bebida

Los resultados de la figura 23, muestra la percepción de la acidez de la bebida fermentada alcanzó valor promedio de 1.23 evaluada con una escala de intensidad de 0 a 5. Por otro lado, se observa que la concentración del inóculo influye en la percepción de la acidez, tal como se muestra en la figura 24.

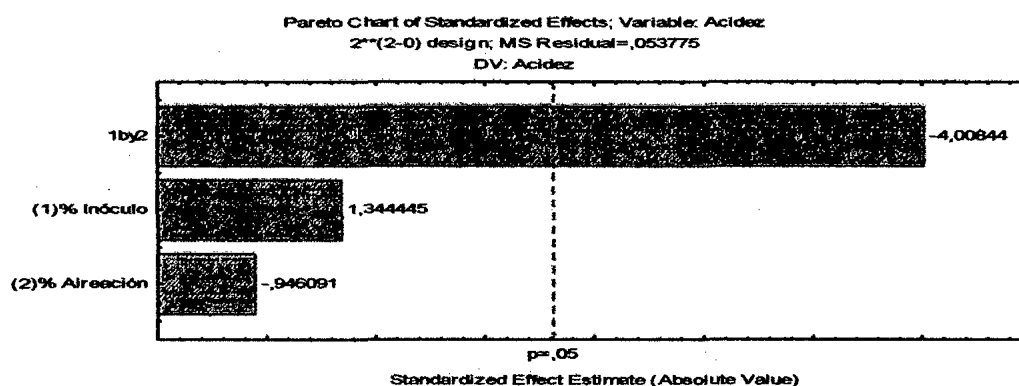


FIGURA 24: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo acidez

Teniendo en cuenta que los factores fijos (% Inóculo y % Aireación) influyen en la percepción de la acidez en la bebida fermentada de lactosuero, fue necesario evaluar la influencia entre tratamientos, cuyo resultado se muestra en la tabla 19.

TABLA 19: Grado de significancia entre tratamientos con respecto al atributo acidez

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	1.10330	
4	3	1.15670	
2	3	1.51330	1.51330
3	3		1.82000
Sig.		0.07100	0.14400

La tabla de Duncan, muestra al tratamiento 2% de inóculo y 0.L/minuto como el mejor de los tratamientos, seguidamente del 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación que no tiene mucha diferencia significativa entre los dos tratamientos, alcanzando valore de 0.07100 de diferencia.

Los resultados del análisis sensorial, con respecto a la inter relación de los atributos, del lactosuero derivado de la fabricación del queso fresco, fermentado con levadura aislada, se presenta en la figura 25.



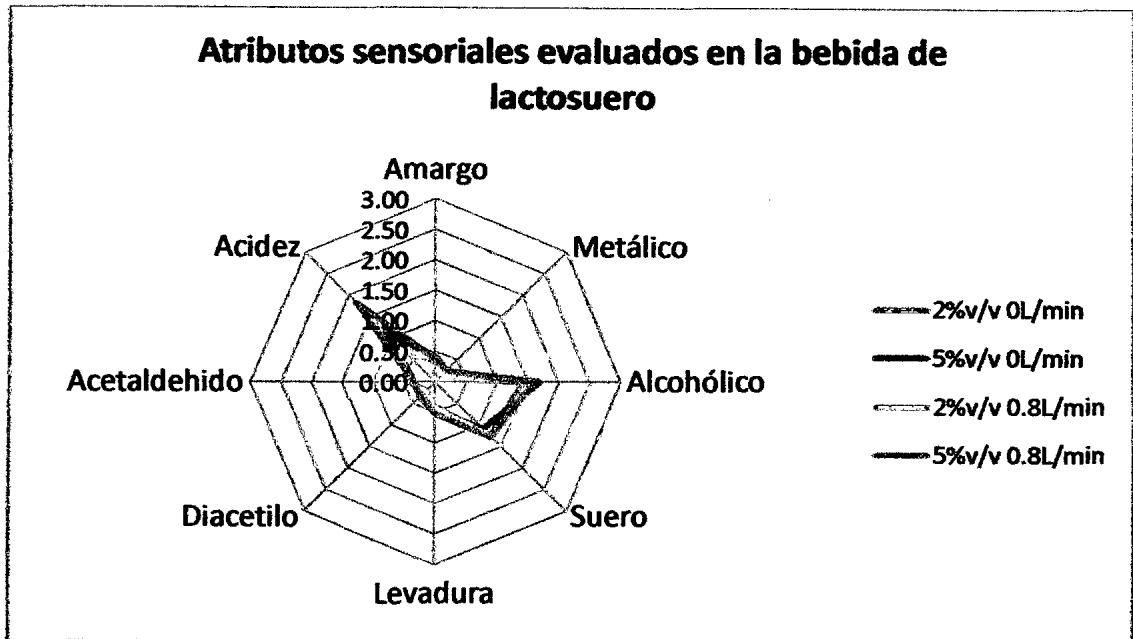


FIGURA 25: Atributos sensoriales evaluados en la bebida de lactosuero

Teniendo en consideración la figura 25, se puede subrayar que en los tratamientos los panelistas afirmaron mayores niveles de percepción del atributo alcohólico, acidez y suero; los atributos que no tuvieron influencia significativa fueron los atributos del amargor, levadura, acetaldehído, diacetilo y metálico como se ha reportado en cada caso.

4.4.3.2. Color de la bebida fermentada

Al igual que en el resto de las características organolépticas que se evaluó existen una serie de factores que inciden en la percepción de los colores en la bebida. Los resultados de la evaluación de color se muestran en la tabla 20.

TABLA 20: Promedio de los valores de percepción del color de la bebida fermentada de lactosuero

Atributo	PUNTUACIONES			
	2%v/v	5%v/v	2%v/v	5%v/v
	0L/minuto	0L/minuto	0.8L/minuto	0.8L/minuto
	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5	Escala 0-5
Intensidad de color	2.04	1.51	1.87	1.73

Estos resultados son válidos para manifestar que la aireación y % de inóculo influye en la variación del color, estos resultados fue de esperarse ya que a mayor concentración de inóculo existe mayor consumo de azúcares fermentables (lactosa), y obtener una bebida más claro, los resultados de la significancia se muestra en la figura 26.

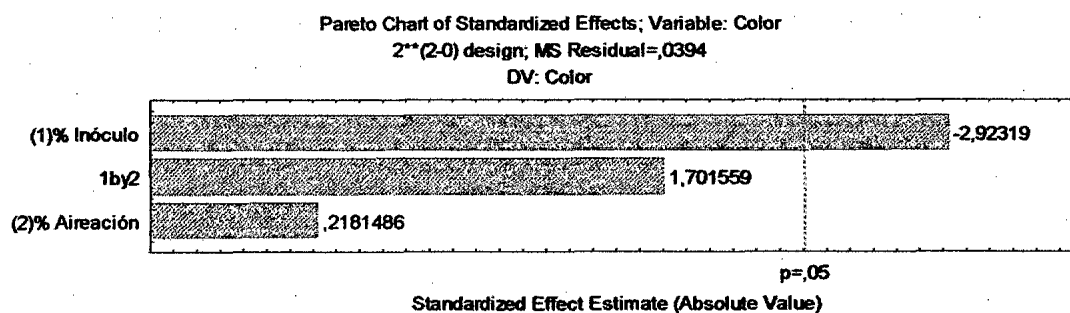


FIGURA 26: Diagrama de Pareto estandarizado para el atributo color

El grado de significancia entre tratamientos se muestra en la tabla 21, donde el mejor tratamiento es 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación.



TABLA 21: Grado de significancia entre tratamientos con respecto al atributo color

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	1.1500	
4	3	1.7300	
2	3	1.8700	1.8700
1	3		2.0400
Sig.		0.0660	0.10400

Por el contrario el resto de los tratamientos presenta tendencias similares en cuanto a la calificación de los panelistas. El ligero desagrado del tratamiento 2%v/v y 0.8L/min se debió a que la bebida presentó cierto olor lácteo que es un color típico de la bebida. Por otro lado por la deficiente familiarización con los sub productos lácteos y la relación con otros productos del mercado, no solo con bebidas sino productos como dulces, cereales entre otros alimentos.

4.4.3.3. Aceptabilidad de la bebida

La aceptabilidad o apariencia general de los tratamientos es evaluado en la figura 27. La mayoría de los panelistas dieron a esta variable un grado de aceptación favorable en todos los tratamientos, pero se presento con mayor aceptabilidad el tratamiento de 5% de inóculo y 0L/min de aireación con un porcentaje de 43.75 de aceptación con un calificativo de me gusta mucho y 18.75% con un calificativo de me gusta moderadamente, en segundo lugar se tuvo al tratamiento de 5% de inóculo con aireación de 0.8L/min que alcanzó un valor máximo de 37.5% con un calificativo de me gusta moderadamente y un porcentaje de 25 con el calificativo de me gusta



levemente, tal como se muestra en la figura 27. Estos resultados nos indican que la bebida fermentada de lactosuero se presenta con una buena aceptabilidad al mercado.

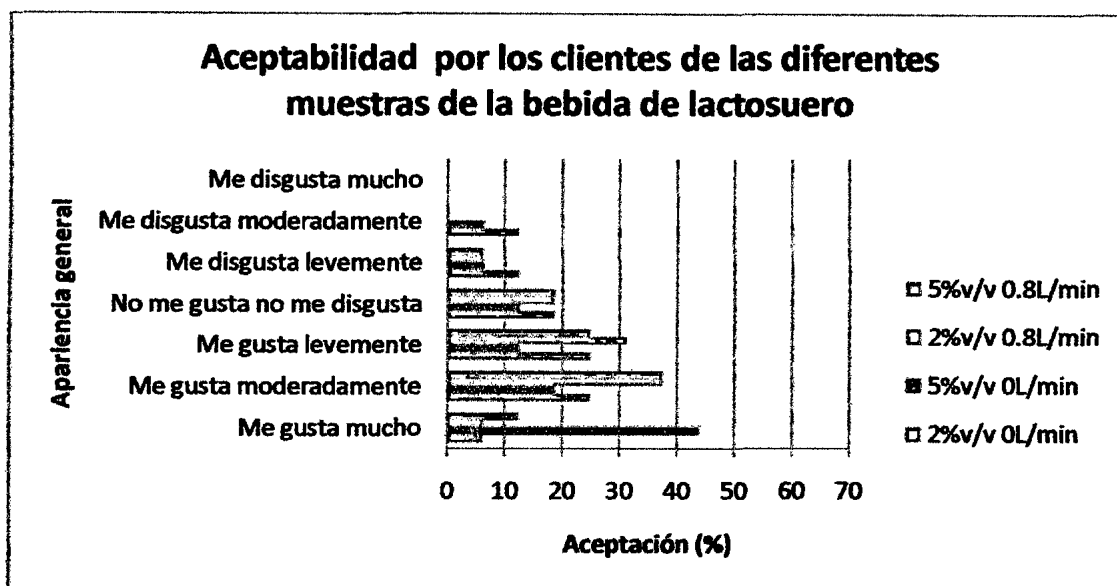


FIGURA 27: Aceptabilidad por los clientes de las diversas muestras de la bebida fermentada a partir de lactosuero

Por otro lado se encuentra en porcentajes menores las calificaciones desfavorables a la bebida fermentada de lactosuero, estos resultados puede deberse a las burbujas que presentó la bebida, que se formaron al momento de servir las muestras para el análisis sensorial. Es necesario mencionar que las burbujas son parte normal de su apariencia, lo panelistas disconformes hubiesen mostrado una aceptación más elevada, las opiniones desfavorecieron la presencia de las burbujas. Posiblemente lo relacionaron la bebida de lactosuero presentado, con jugo de frutas que puesto en un vaso no presenta burbujas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se logró elaborar una bebida fermentada a partir de lactosuero, mediante un proceso de fermentación con levadura aislada. Se obtuvo un máximo de 3.55% de etanol que le corresponde al tratamiento de 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación y un pH final de 4.2. La evaluación sensorial de la bebida alcohólica, demuestra que la bebida obtiene un 43.75% de aceptación con el calificativo de “me gusta mucho”
- Se ha realizado el proceso de aislamiento, identificación y mantenimiento de la cepa aislada como etapa preliminar al proceso fermentativo de la bebida de lactosuero. La cepa Kc BA-IA-2009-II fue seleccionada por las siguientes razones: por tener la habilidad de tolerar hasta 6% de etanol exógeno, habilidad de tolerar ácido acético en concentraciones de 500mg/L., formación débil de película, menor tiempo de conversión de los azúcares fermentables en etanol, producir 3.16% de etanol en 96 horas, características que fueron satisfactorios para la selección de la cepa Kc BA-IA-2009-II.
- El proceso de aireación en relación a la concentración del inóculo durante el proceso fermentativo influye sobre el atributo alcohólico y es enmarcado como el mejor tratamiento al 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación alcanzando valores



de 1.63 medidas en una escala de 1 a 5, por otro lado el tratamiento 1, 4 y 2 son estadísticamente iguales y diferente al tratamiento 3. Del mismo modo se concluye que la concentración de inóculo influyó significativamente en la percepción a suero, mas no con la interrelación de la aireación ni la aireación propiamente dicho, mostrando como mejor tratamiento a 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación, por otro lado señalar que el tratamiento 4 y 3 son estadísticamente iguales y el tratamiento 1 y 2 de la misma forma. El inóculo en relación con la aireación también influyeron significativamente con respecto al atributo acidez y los tratamientos 1, 4 y 2 son estadísticamente iguales y diferentes estadísticamente con el tratamiento 3. La concentración de inóculo influye en la percepción del color, teniendo al tratamiento 3, 4 y 2 estadísticamente iguales, pero distintos al tratamiento 1, obtenido como el mejor tratamiento a 5% de inóculo y 0L/minuto de aireación. Mientras que los atributos que no presentaron significancia fueron: amargo, metálico, levadura, diacetilo y acetaldehído.

- El proceso de aireación en relación a la concentración de inóculo en el proceso fermentativo no influye en las definiciones de las características fisicoquímicas de la bebida fermentada.

5.2. Recomendaciones

- Realizar análisis microbiológico de la bebida para determinar los microorganismos presentes por causas de contaminación y establecer los máximos permitidos en un periodo de tiempo.
- Realizar estudios complementarios para confirmar su genotipo y además para identificar la especie a la que pertenecen las levaduras utilizadas.
- Utilizar jugo de maracuyá para mejorar la aceptación del consumidor.
- Evaluar la vida útil de la bebida fermentada a partir de lactosuero, con la finalidad de comercializar en un periodo determinado y no causar intoxicación a los consumidores.
- Proponer una marca y un tipo de envase para la bebida fermentada de lactosuero, que favorezca la comercialización de la bebida.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC 920.105, (1990). Determinación de proteínas. Método Khejdal.
- AOAC 920.105, (1990). Determinación de caseína. Método Khejdal.
- Al Dabbagh, F. (1980). Utilization of hest 98erevisiae98n whey protein. Dairy Sc. Abst. 42(1): 102 p.
- Anzaldúa, A. (1993). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica.
- Artavia, W. (1990). Elaboración de queso ricota a base de suero lácteo. Trabajo de graduación. Guácimo, Costa Rica. EARTH. 40 p.
- Athanasiadis, I., A. Paraskevopoulou, G. Blekas and V. Kiosseoglu. (2004). Development of novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. Biotech. Prog. 20:1091 – 1095.
- Badui, S. (1977). Revista Tecnología Alimentos, enero-febrero, propiedades y uso del suero de leche.
- Banavara, D.; Anupama, D. and Rankin, S. (2003). Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. J. Dairy Sci. 86: 3866 – 3875.
- Bellissimi, E y Ingledew, W. (2004). Metabolic acclimatization: preparing active dry yeast for fuel ethanol production. Process Biochemistry. Vol 40. 2205-2213 p.
- Belloch, C., Barrio E., Uruburu F., García M. y Querol A. (1997). Characterization of four species of the genus Kluyveromyces by 98erevisiae98n98 analysis.



- System appl. Microbiol; 20: 397 – 408.
- Ben – Hassan, R. and Ghaly, A. (1994). Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* I cheese whey for pollution potential production. Appl. Biochem. Biotechnol. 47, 89 – 105.
- Boekhout, T. y Kutzman, C. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En: Wolf K (Eds.) Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook. Berling, Germany: 1-81.
- Bremond, E. (1966). Tecnicas modernas de vinificación y de 99erevisiae99n de los vinos. José Monteso Edotor. Barcelona, España. p. 42-47
- Carvalho, M. and I. Spencer Martins (1990). Modes of lactose uptake in the yearst species *Kluyveromyces marxianus*. Antonie van Leeuwenhoek. 57 (2): P. 77-81
- Cavadini C.; Siega Riz, A. and Popkin, B. (2000). US adolescents' food intake trends from 1965 – 1996. Arch. Dis. Childhood; 83: 18 – 24.
- Desrosier, N. (1988). Elementos de tecnología de alimentos. CECSA, D.F., Mexico. 783 p.
- Divies, C.; Cachon J. Cavin And H. Prescott. (1994). Theme 4: Immobilized Cell 99erevisiae in wine production. Critical Rev. In Biotech. 145(2) p. 135-153.
- Early, R. (2004). Tecnología de los Productos Lácteos, 2da edición, Acribia, Zaragoza. España.

- Estela, E. W. (2004). Study and analysis of metabolites of sensorial importance produced by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. Tesis de Doctorado Capitulo I. Universidad de Tecnología Química. Praga – Republica Checa.
- FAO. (2004). Chapitre 7 Lactosérum. Internet. www.Fao.Org/Docrep/T4280f-/T4280f0h.Htm, Extraído Al 17/08/2008. 6:30pm.
- Foster, M.; Nelson F.; Speck M.; Doetsch R. y Olson J.C. (1969). Microbiología de la leche, 1ª ed., México p.465-466.
- Freire, M. (1997). Production of nutraceuticals from whey permeates fermentation by *Kluyveromyces marxianus* var. Annual Meeting Abst. Departament of Food Science and Agricultural Chemistry. Mc Gill University. Quebec. Canada.
- Furtado, M. (1999). Principias Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção, Fonte Comunicações e Editora, São Paulo.
- Garibay, G.; R. Quinteros R. y A. Munguia L. (1993). Biotecnología Alimentaria. Limusa Noriega Editores. México. P.152-233.
- Gawel, J. and F. Kosikowski. (1978). Application of acid lactase to wine makin from cottage cheese whey concentrate. Dairy Sci. Abst. 41(1): p. 656-663.
- Gillies, M. (1974). Whey Processing and Utilization, Noyes Data Corporation, New Jersey.
- Grba, S.; Stehlik, Tomas V.; Stanzer D.; Vahcic N. y Skrlin A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on

- whey. *Chem. Biochem. Eng.*, 16 (1), 13-16.
- Gruetzmacher, T. J. and Bradley, Jr. R. (1991). Acid whey as a replacement for sodium caseinate in spray – dried coffee whiteners. *J. Dairy Sci.* 74: 2838 – 2849.
- Guimaraes, W.; Dudey, G. e Ingram, L. (1992). Fermentation of sweet whey by ethanologenic. *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 41 – 45.
- Inda C. (2000). Optimización de rendimientos y aseguramiento de inocuidad de la industria quesera. Organización de estados Americanos. Saltillo, Mexico. 157 p.
- Itara, L. (2007). Elaboración de una bebida fermentada a partir de un suero ácido y leche. Tesis. Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico. 93 p.
- Janssens, J.; and B. Baileyb. (1984). Ethanol from wley: Continuous fermentation with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 34:1-5.
- Jelen, P. (1992). Whey: composition, properties, processing and uses. In *Encyclopedia of Food and Technology*; Hoi, Y.H., Ed.; John Wiley and Sons: New York, pp 2835 – 2845.
- Keating, P. (2002). *Introducción a la Lactología*, Limusa, México.
- Kilian, S.; Van Demeter; J. Kock and J. Preez. (1991). Occurrence and taxonomic aspects of proton movements coupled to sugar transport in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Antonie van leeuwenhoek* 59 (3): 199-206.
- Kosikowski, F. (1982). *Cheese and Fermented Milk Foods*, 2 ed., Kosikowski and

Associates, New York.

Kurtzman, C. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*. P. 1727 – 1740

Lafon Lafourcade, S.; Geneix, C. y Ribereau Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape musts by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl Environ Microb*, 47: 1246 – 1249.

Linden G. y Lorient D. (1996). Valorización de los coproductos. En su *Bioquímica agroindustrial. Revalorización alimentaria de la producción agrícola*. 1ª edición. Zaragoza (España), Ed. Acribia, S.A., 215 – 229 p.

Lodder, J. (1970). *The yeast*. North-Holland Publishing Editorial Company. Amsterdam-The Netherlands. 316-359 p.

Loureiro, V. and Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci Technol*. 10: 1-10.

Mabouis, J. L. (2004). *Protéines Du Lait, Protéines De Toujours, Protéines D'Avenir*, I.N.R.A., Internet. Maubois@Rennes.Inra.Fr.

Madrid, A. (1996). *Curso de industrias lácteas*. Mundi-Prensa. 604 p.

Madriñan, C. (1988). *Módulo de química de los alimentos*. Universidad del valle. 527 p.

Mareca, I. (1968). *Enología*. Editorial Alhambra S.A. España. P. 242-249, P. 110-120.

Marshall V.; Tamine, A. (1997). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Blackie Academic & Professional, Second Edition, London.

Marth, E. (1973). *Aprovechamiento del suero por fermentación*, Julio/ Agosto.



- Marwaha, S. and J.F. Kennedy. (1988). Review: Whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 323 – 336.
- Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource technol.* 47: 195-203.
- Mc Ghee, J.; J. Grant and R. Detroy. (1982). Continuous and static fermentation of glucose to ethanol by immobilized *Sacharomyces 103erevisiae* cells of different ages. *Appl. Environ. Microbiol.* P. 19-22.
- Morales, A. (2002). Elaboración de una bebida como resultado del manejo del suero láctico. Trabajo de graduación. Guácimo. Costa Rica. Universidad EARTH. 50p.
- Murtagh, J. (1995). Whey as a feedstock for alcohol production. Chapter 4 in *The Alcohol Textbook* eds T. P Lyons, D. R. Kelsall, and J. E. Murtagh, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- National Digestive Diseases Information Clearinghouse (NDDIC). National institute of neurological disorders and stroke (España), p. 2, Agosto de 2005.
- National Centre Of Biotechnology Information (NCBI). (1999). WWW.nvbi.gov.pe, extraído al 16/08/2009. 6:10pm.
- Nielsen S.; Siega Riz A. and Popkin Bm. (2002). Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. *Prev. Med.* 35: 107 – 113.
- Nielsen, S. and Popkin B. (2004). Changes in beverage intake between 1977 and 2001. *Am. J. Prev. Med.* 27: 205 – 210.
- NTP 202.116, (1998). Leche y productos lácteos. Leche cruda. Determinación de la



acidez de la leche.

NTP 202.109, (1988). Leche y productos lácteos. Determinación de los azúcares totales, reductores y no reductores.

Ocampo, C.; Urbina, C.; Juárez R.; Ruiz O. y Galíndez M. (2000). Depuración del suero común cultivo mixto de levaduras, utilizando un sistema por lote alimentado y alimentado repetido. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, México, 20, 44-52.

Ortiz, M.; Noventa, F. (1998). Proyecto de manejo del suero de la leche en el centro de procesamiento de alimentos. Proyecto de curso. Guácimo, Costa Rica. EARTH. 10p.

Oura, E. (1977). Reaction products of yeast fermentation. *Process Biochem*, 12: 19 – 21.

Pachón, J. (1997). Puesta en marcha de un biorreactor airlift y pruebas preliminares con el hongo de té. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia P. 4,5 18-20, 23-27.

Palmer, G. (1979). Modern technology transforms whey into wine. *Dairy Sci. Abst.* 41:861p.

Pearson, D. (1976). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia S.A. España. 331p.

Pena, A. ; Cinco G. ; Gomez A. y Tuena M., (1972). Effect of pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem biophys*, 153: 413 - 425.



- Peña, R. (1984). Estudio experimental de la fermentación alcohólica del suero de quesería. Ing. Industrias alimentarias. Tesis para optar el grado de Ingeniero en Ingeniería Alimentaria. UNALM. 112 p.
- Phaff, E. (1985). Biology of yeast other than *Saccharomyces*. En "Biology of industrial Microorganisms" A. Demain and N. Solomon, Eds. U.S.A. 537-562p.
- Ranken, M. (1988). Manual de industria de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 672p.
- Revillion J.; Brandelli, A. y Zachia, M.A. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. Braz. Arch. Biol. Technol., 46 (1), 1-12.
- Ribéreau, J. ; Peynaud, E. and Lafon M., (1956). Investigations on the origin of secondary products of alcoholic fermentation, part II. Am Erol Vitic, 7: 112 - 118.
- Rieger, M. (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxydation of glucose by *Saccharomyces serevisiae*. Gen microbiol, 129: 653 - 661.
- Rose, A. (1971). Economic microbiology: microbial Biomass. V. 4. London. Academy Press. P. 208 - 256.
- Shuler, M. and Kargi, F. (1992). Bioprocess engineering: basics concepts. New Jersey, USA. Editorial prentice Hall. P. 25.
- Sendra, J. y Carbonell, J. (1999). Centro de Información Cerveza y Salud del IATA/CSIC. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y



- sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Madrid, España, p. 65.
- Sienkiewicz, T. (1980). Production of wine and ethanol from whey. Dairy Sci. Abst. 42(7): 423P.
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresour. Technol. 57, 1 – 11.
- Sloan, E. (2006). Top 10 functional food trends. Technology, April, 60(4): p.22-40.
- Soto, H. (2006). Comunicación Personal. Escuela de Zootecnia. Universidad de Costa Rica.
- Sottiez, P. (1993). Subproductos derivados de la elaboración de los quesos. EN LUQUET M. François. Leche y productos lácteos vaca – oveja – cabra. Zaragoza (España), Ed. Acribia, S.A., 1993, Vol. 2, p. 287 – 219.
- Spreer, E. (1991). Litología Industrial, Caracteres composición y estructura de la leche, Editorial Acribia, Segunda edición, Zaragoza.
- Stabury, P. and Whiraker, A. (1987). Principles of fermentation technology. Pergamon press. New Jersey. P. 17-53.
- Stanley G. and Pamment, N., (1993). Transport and intracellular accumulation of acetaldehyde in *Sacharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng, 42: 24 - 29.
- Stevenson, S. (2002). Me gustaría comprarle al mundo una bebida láctea. La república, 27 y 28 de Abril de 2002. San José.
- Tamime, A.; Robinson, R.K. (1991). Yogur: ciencia y tecnología. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 368 p.



- Tortora, G.; Funke, B. y Case C.L. (1993). *Introducción a la microbiología*, 3ª ed., Acribia, S.A., Zaragoza, España p. 284-285.
- Ureña, M. y Arrigo, M. (1999). *Evaluación sensorial de los alimentos*. Universidad Nacional Agraria la Molina. Primera Edición. Editorial Agraria. Lima - Perú. 197 p.
- Varnam, A. y Sutherland, J. (1994). *Leche y productos lácteos*. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 167 – 191 p.
- Vrisseyre, R. (1980). *Lactología técnica*, 2ª ed., Acribia, Zaragoza, España, 454-459, 586-588.
- Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. and Van Boekel, M.S. (1999). *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. Marcell Dekker. Inc. New York.
- Wisconsin Center for Dairy R. (2002). *Dairy Pipeline*, June 2002, Volume14, Number 2, KJ. Burrington.
- Yang, H.; F. Bodyfelt and K. Berggen. (1979). *Utilization of cheese whey for winw production*. Dairy Sc. Abst. 41 (4): 89P.
- Zhidkov, V.; A. Khramtsov and S. Vasilison. (1981). *Manufacture of purified whey concentrate for the preparation of beverages*. Dairy Sci. Abst. 43 (2): 84.

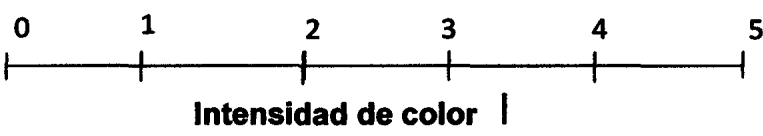


APÉNDICE



Apéndice 1: Hoja de Evaluación del Panel Sensorial

Apéndice 1.1. Test de control para diferenciar

TEST DE CONTROL PARA DIFERENCIAR	
Nombre: _____ Fecha: _____ Nº de panelista: _____	
Muestra patrón: Bebida fermentada de lactosuero	
Atributo: COLOR	
Instrucciones: 1. Ud. recibirá 12 muestras de prueba rotuladas con un código de 3 dígitos y una muestra patrón. 2. Evalúe de izquierda a derecha, comparando cada muestra con la muestra patrón. Determine la intensidad en color y marque con una línea vertical sobre la escala lineal mostrada abajo. Indique el código sobre la línea vertical.	
Escala Lineal	
Comentarios: _____ _____ _____ _____	

Apéndice 1.2. Hoja de evaluación para análisis descriptivo

ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO																			
Nombre: _____ Fecha: _____ Nº de panelista: _____																			
Tipo de muestra: Bebida fermentada de lactosuero																			
Instrucciones:																			
Por favor coloque una línea vertical sobre la escala lineal en el punto donde mejor describa ese atributo en la muestra.																			
Escala de intensidad																			
Amargo	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Metálico	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Alcohólico	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Suero	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Levadura	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Diacetilo	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Acetaldehído	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Acidez	<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td colspan="6" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Mínimo</td> <td colspan="4"></td> <td style="text-align: center;">Máximo</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	----- ----- ----- ----- -----						Mínimo					Máximo
0	1	2	3	4	5														
----- ----- ----- ----- -----																			
Mínimo					Máximo														
Comentario																			
.....																			
.....																			
.....																			



Apéndice 1.3. Hola de evaluación para aceptabilidad

TEST DE CONTROL PARA ACEPTABILIDAD	
Nombre: _____ Fecha: _____ Nº de panelista: _____	
Tipo de muestra: Bebida fermentada de lactosuero	
Instrucciones: Para cada muestra luego de su primera impresión responda cuanto le agrada o desagrada la bebida alcohólica fermentada a partir de lactosuero, evalúe la muestra de 1 a 7 utilizando la escala adjunta y coloque el código de la muestra en el punto elegido	
<p style="text-align: center;">Aceptabilidad</p> <ol style="list-style-type: none">7. me gusta mucho6. me gusta moderadamente5. me gusta levemente4. no me gusta ni me disgusta3. me disgusta levemente2. me disgusta moderadamente1. me disgusta mucho	
Comentarios: _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	



Apéndice 2: Resultados del análisis físico-químico y nutricional

Apéndice 2.1: resultados del análisis fisicoquímico

Apéndice 2.1.1. Resultados de la acidez y pH

Tiempo (Hrs)	5% inóculo	OL/minuto	5% inóculo	0.8L/minuto	2% inóculo	OL/minuto	2% inóculo	0.8L/minuto
	pH	Acidez (g/L)	pH	Acidez (g/L)	pH	Acidez (g/L)	pH	Acidez (g/L)
0	5.600	0.155	5.600	0.159	5.600	0.151	5.600	0.148
12	5.467	0.171	5.387	0.180	5.367	0.172	5.470	0.172
24	5.100	0.288	5.117	0.267	5.100	0.205	5.317	0.227
36	4.900	0.346	4.867	0.293	4.800	0.265	5.077	0.259
48	4.667	0.380	4.623	0.377	4.600	0.370	4.893	0.312
60	4.467	0.414	4.493	0.430	4.500	0.408	4.743	0.352
72	4.300	0.455	4.383	0.474	4.433	0.446	4.540	0.422
84	4.200	0.493	4.347	0.521	4.367	0.488	4.417	0.469
96	4.200	0.522	4.303	0.527	4.300	0.500	4.347	0.507

Apéndice 2.1.2. Resultados del contenido de etanol

Tiempo (Horas)	5% inóculo	OL/minuto	5% inóculo	0.8L/minuto	2% inóculo	OL/minuto	2% inóculo	0.8L/minuto
	Etanol (%)		Etanol (%)		Etanol (%)		Etanol (%)	
0	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
12	0.3844		0.4133		0.2133		0.3033	
24	0.8400		1.3700		0.6533		0.6400	
36	1.2123		1.8800		1.1833		1.0700	
48	1.8301		2.1700		1.5700		1.7467	
60	2.3027		2.4667		1.9100		2.2033	
72	2.9467		2.7733		2.4433		2.5067	
84	3.4000		3.3233		2.9333		2.7433	
96	3.5538		3.4667		3.1033		2.8700	

Apéndice 2.1.3. Resultados de densidad

Tiempo (Horas)	5% inóculo	OL/minuto	5% inóculo	O.8L/minuto	2% inóculo	OL/minuto	2% inóculo	O.8L/minuto
	Densidad		Densidad		Densidad		Densidad	
0	1.0351		1.0350		1.0350		1.0349	
12	1.0335		1.0337		1.0339		1.0339	
24	1.0325		1.0327		1.0331		1.0330	
36	1.0313		1.0314		1.0319		1.0316	
48	1.0301		1.0303		1.0306		1.0307	
60	1.0296		1.0295		1.0300		1.0296	
72	1.0286		1.0285		1.0290		1.0291	
84	1.0282		1.0279		1.0287		1.0286	
96	1.0280		1.0280		1.0285		1.0284	

Apéndice 2.2: Resultados del análisis nutricional

Apéndice 2.2.1. Resultados del contenido de proteína

Producto	5% inóculo	OL/minuto	5% inóculo	O.8L/minuto	2% inóculo	OL/minuto	2% inóculo	O.8L/minuto
	Proteína (g/L)		Proteína (g/L)		Proteína (g/L)		Proteína (g/L)	
lactosuero	0.82		0.84		0.86		0.87	
Bebida	0.47		0.48		0.48		0.49	

Apéndice 2.2.2. Resultado de lactosa

Producto	5% inóculo	OL/minuto	5% inóculo	O.8L/minuto	2% inóculo	OL/minuto	2% inóculo	O.8L/minuto
	Lactosa (g/L)		Lactosa (g/L)		Lactosa (g/L)		Lactosa (g/L)	
lactosuero	4.92		4.97		5.06		4.97	
Bebida	3.21		3.27		3.32		3.3	

Apéndice 3: Resultados de análisis de varianza

Apéndice 3.1: Análisis de Varianza para Lactosa

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,004408	1	0,004408	1,191441	0,306818
B:Aireación	0,000675	1	0,000675	0,182432	0,680554
AB	0,015408	1	0,015408	4,164414	0,075593
Error total	0,029600	8	0,003700		
Total (corr.)	0,050092	11			

Apéndice 3.2: Análisis de Varianza para Proteína

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,000133	1	0,000133	0,063492	0,807412
B:Aireación	0,000300	1	0,000300	0,142857	0,715288
AB	0,000533	1	0,000533	0,253968	0,627877
Error total	0,016800	8	0,002100		
Total (corr.)	0,017767	11			

Apéndice 3.3: Análisis de Varianza para el Color

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,336675	1	0,336675	8,545051	0,019197
B:Aireación	0,001875	1	0,001875	0,047589	0,832775
AB	0,114075	1	0,114075	2,895305	0,127252
Error total	0,315200	8	0,039400		
Total (corr.)	0,767825	11			

Apéndice 3.4: Análisis de Varianza para el atributo Alcohólico

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,116033	1	0,116033	2,782574	0,133850
B:Aireación	0,038533	1	0,038533	0,924061	0,364561
AB	0,240833	1	0,240833	5,775380	0,042962
Error total	0,333600	8	0,041700		
Total (corr.)	0,729000	11			

Apéndice 3.5: Análisis de Varianza para el atributo Acidez

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,097200	1	0,097200	1,80753	0,215679
B:Aireación	0,048133	1	0,048133	0,89509	0,371798
AB	0,864033	1	0,864033	16,06757	0,003904
Error total	0,430200	8	0,053775		
Total (corr.)	1,439567	11			

Apéndice 3.6: Análisis de Varianza para el atributo Suero

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,081675	1	0,081675	8,934366	0,017359
B:Aireación	0,020008	1	0,020008	2,188696	0,177291
AB	0,020008	1	0,020008	2,188696	0,177291
Error total	0,073133	8	0,009142		
Total (corr.)	0,194825	11			

Apéndice 3.7: Análisis de Varianza para el atributo Levadura

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,016875	1	0,016875	0,655340	0,441621
B:Aireación	0,003675	1	0,003675	0,142718	0,715420
AB	0,001875	1	0,001875	0,072816	0,794111
Error total	0,206000	8	0,025750		
Total (corr.)	0,228425	11			

Apéndice 3.8: Análisis de Varianza para el atributo Amargor

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,004408	1	0,004408	0,256921	0,625916
B:Aireación	0,007008	1	0,007008	0,408451	0,540620
AB	0,000408	1	0,000408	0,023798	0,881221
Error total	0,137267	8	0,017158		
Total (corr.)	0,149092	11			

Apéndice 3.9: Análisis de Varianza para el atributo Diacetilo

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,001008	1	0,001008	0,059198	0,813891
B:Aireación	0,008008	1	0,008008	0,470157	0,512292
AB	0,007008	1	0,007008	0,411448	0,539174
Error total	0,136267	8	0,017033		
Total (corr.)	0,152292	11			

Apéndice 3.10: Análisis de Varianza para el atributo Acetaldehído

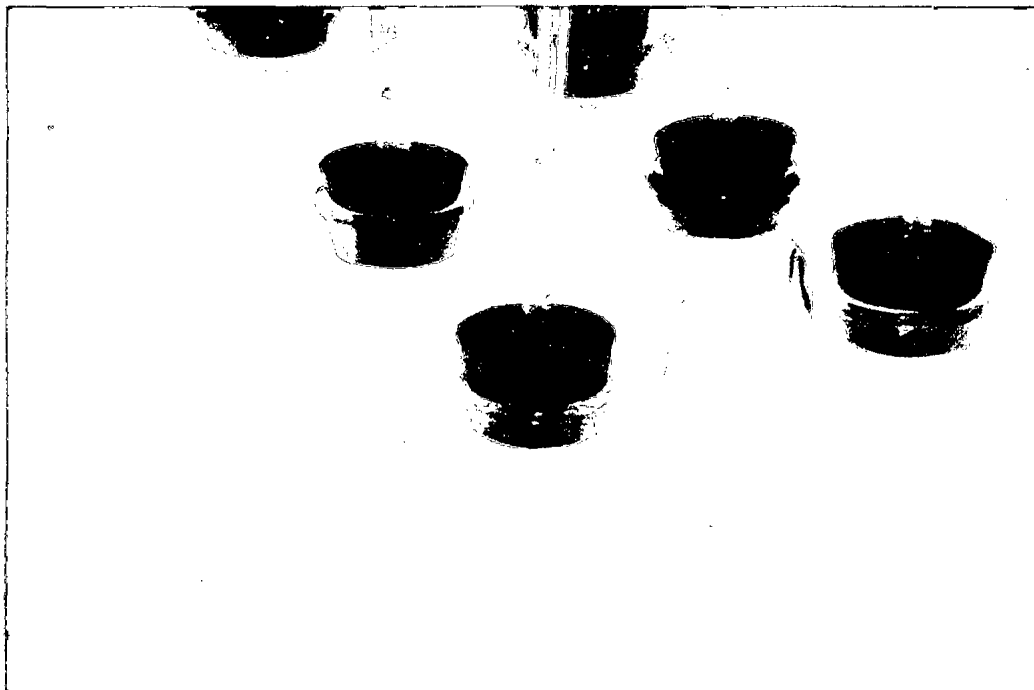
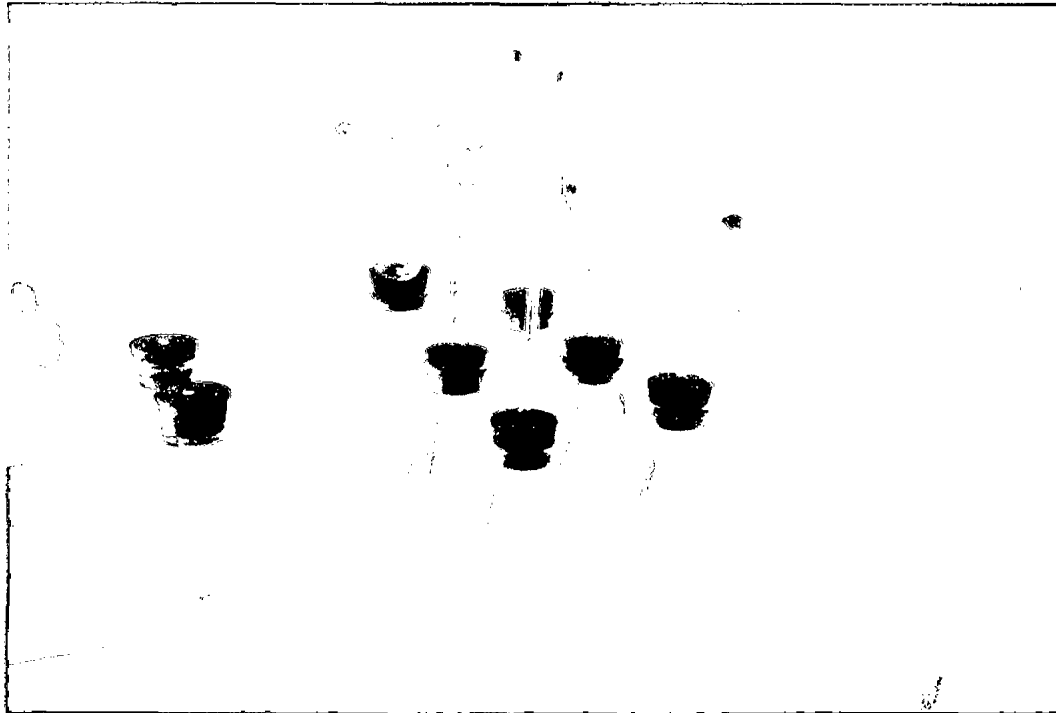
<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,013333	1	0,013333	1,315789	0,284495
B:Aireación	0,005633	1	0,005633	0,555921	0,477241
AB	0,003333	1	0,003333	0,328947	0,582040
Error total	0,081067	8	0,010133		
Total (corr.)	0,103367	11			

Apéndice 3.11: Análisis de Varianza para el atributo Metálico

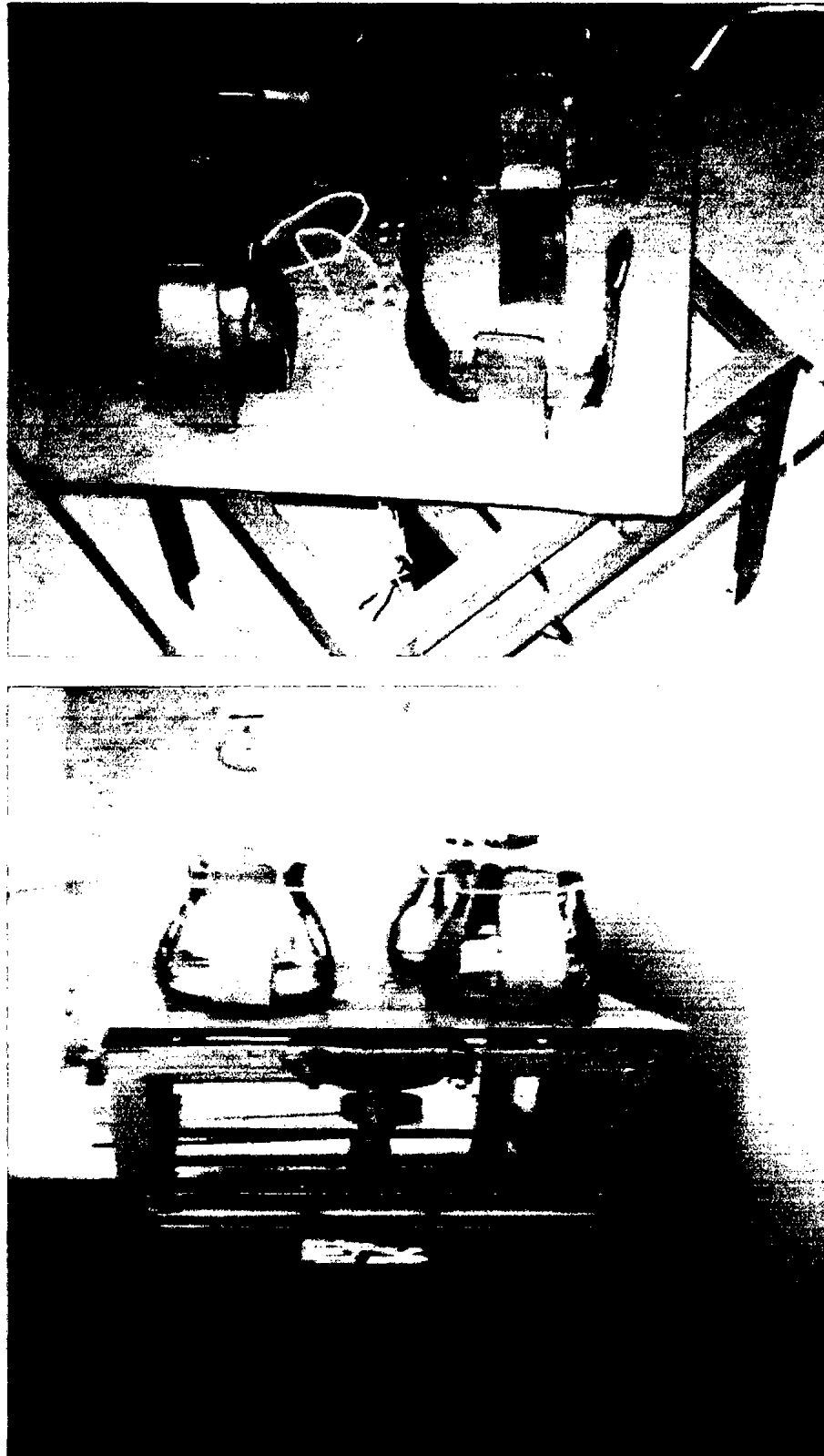
<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Inóculo	0,009633	1	0,009633	1,513089	0,253611
B:Aireación	0,002700	1	0,002700	0,424084	0,533162
AB	0,001200	1	0,001200	0,188482	0,675654
Error total	0,050933	8	0,006367		
Total (corr.)	0,064467	11			

Apéndice 4: fotografías del proceso de obtención de la bebida

Apéndice 4.1. Fotografía de las gargantas de cisne



Apéndice 4.2: fotografía del agitador orbital



Apéndice 4.3: fotografía del biorreactor

