



# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Uso del lactosuero para la producción de bioetanol.**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

**AUTOR:** Castillo Jaramillo, Johanna Katherine

**DIRECTOR:** Arévalo Torres, Ricardo Javier Mgtr.

LOJA - ECUADOR

2019



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2019

## **APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Magister

Ricardo Javier Arévalo Torres.

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Título del trabajo de titulación" realizado por: Castillo Jaramillo Johanna Katherine, ha sido orientando y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2019

f) .....

## DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Castillo Jaramillo Johanna Katherine** declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Uso del lactosuero para la producción de bioetanol, de la Titulación de Ingeniero en Alimento, siendo el Mgtr. Ricardo Javier Arévalo Torres, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Firma: .....

Autor: Johanna Katherine Castillo Jaramillo

Célula: 1750956771

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a DIOS y la virgen María por iluminarme en este arduo camino y ser la fuerza de voluntad que me ha permitido prevalecer y no decaer, por ser luz en mi vida, por brindarme la sabiduría y la inteligencia necesaria, para cumplir esta meta.

A mis seres amados, mis padres Nelson y Aida que son mi pilar fundamental, mi fuerza y mi sustento para continuar y ser aquellos cómplices que con amor, constancia y esfuerzo me han compartido su incondicional apoyo en este proceso universitario.

A mis hermanos Stalin y Mario, a mi sobrino Thiago y demás familiares, amigos que formaron parte de este logro académico.

Con mucho Amor

**Johanna Castillo.**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente a Dios por el milagro de la vida, a mis padres, por ser la luz y la inspiración que he necesitado a todo momento para llegar a mi objetivo.

Mis sinceros agradecimientos al Mgtr. Ricardo Javier Arévalo Torres, que ha sido mi guía durante todo este transcurso por brindarme todos sus conocimientos que aportaron a este trabajo de titulación.

A todos mis docentes en especial al Mgtr. Jorge Felipe Reyes Bueno, Mgtr. José Miguel Fernández Arias, Ing. Carlos Fabián Aguilar Carrión y al Ing. Holger Isidro Jaramillo Encalada que gracias a su predisposición fue posible desarrollar mi proyecto.

A enamorado Edgar Correa quien ha estado junto a mí en este caminar, por no dejarme desmayar y motivarme a ser mejor.

A mis apreciados y grandes amigos, y a la vez compañeros de carrera: María, Anabel, Yomara, Alejandro y Juan Carlos por su sinceridad y sana amistad.

A esta distinguida institución **UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA** y a la titulación **INGENIERO EN ALMIENTOS** por darme esta gran oportunidad de crecer y formarme como profesional.

**GRACIAS.**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Aprobación del director del trabajo de fin de titulación</b>	<b>ii</b>
<b>Declaratoria de autoría y cesión de derechos</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>iv</b>
<b>Agradecimiento</b>	<b>v</b>
<b>Índice de contenidos</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 1: Revisión Bibliográfica</b>	<b>4</b>
1.1. Lactosuero	5
1.2. Tipos de lactosuero	5
1.2.1. Suero dulce	5
1.2.2. Suero ácido	5
1.3. Composición y características del lactosuero	5
1.3.1. Proteínas de lactosuero	6
1.3.2. Lactosa	7
1.3.3. Lípidos	7
1.3.4. Vitaminas	7
1.3.5. Minerales	7
1.4. Hidrólisis enzimática	7
1.4.1. Glucosa y galactosa	8
1.5. Aplicaciones industriales	8
1.6. Proceso de la obtención del permeado	9
1.7. Aplicaciones industriales del permeado de suero	9
1.8. Fermentación alcohólica	9
1.9. Levaduras	10
1.9.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.9.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	11

1.10.	Ciclo de crecimiento de las levaduras	11
1.11.	Condiciones en el proceso de fermentación	12
1.11.1.	Temperatura	12
1.11.2.	pH	12
1.11.3.	Grados Brix	12
1.12.	Etanol	13
1.13.	Destilación simple	13
1.14.	Grado alcohólico	13
<b>2.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>14</b>
2.1.	Diagrama de la investigación	15
2.2.	Materia Prima	15
2.3.	Proceso de hidrólisis	16
2.4.	Fermentación	17
2.5.	Destilación	18
2.6.	Análisis fisicoquímicos	19
2.6.1.	Grados Brix	19
2.6.2.	Grado alcohólico	19
2.7.	Análisis estadístico	20
<b>3.</b>	<b>Resultados y Discusión</b>	<b>21</b>
3.1.	Resultados de la Investigación	22
3.2.	Análisis de Varianza	24
3.3.	Brix en la fermentación	25
3.4.	Optimización de los parámetros de la fermentación	25
3.5.	°GL en la fermentación	26
	<b>Conclusiones</b>	<b>27</b>
	<b>Recomendaciones</b>	<b>28</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>29</b>
	<b>Anexos</b>	<b>34</b>
	Anexo A.-Ficha técnica del permeado de leche	35
	Anexos B.-Ficha técnica de la enzima Mayalac 5000	37
	Anexos C.- Norma INEN 340	38



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los tipos de lactosuero .....	5
Tabla 2. Características fisicoquímicas del lactosuero líquido.....	6
Tabla 3. Composición de las proteínas del lactosuero .....	6
Tabla 4. Concentraciones de vitaminas en el lactosuero .....	7
Tabla 5. Tamaño de membranas .....	9
Tabla 6: Fases de crecimiento de las levaduras .....	12
Tabla 7. Condiciones de la enzima $\beta$ -galactosidasa (Mayalac 5000). .....	16
Tabla 8. Parámetros de fermentación .....	17
Tabla 9. Diseño aleatorio para los tratamientos empleados .....	20
Tabla 10. Resultados de °Brix y °GL de los tratamientos .....	23
Tabla 11. Análisis de varianza de los factores aplicado .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Estructura de la hidrólisis de la lactosa .....	8
Figura 2: Esquema general de la fermentación alcohólica .....	10
Figura 3: Curva de crecimiento de las levaduras .....	11
Figura 4: Hidrólisis en baño maría .....	16
Figura 5: Tratamiento térmico del suero hidrolizado.....	17
Figura 6: Fermentación en baños maría .....	18
Figura 7: Proceso de la destilación simple .....	18
Figura 8: Medición de los °Brix .....	19
Figura 9: Medición de °GL .....	19
Figura 10: Valores de los °Brix después de la fermentación .....	25
Figura 11: Optimización de los °Brix en la fermentación .....	26
Figura 12: Valores de los °GL después del proceso de destilación .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°Brix:** sólidos solubles expresado en % de sacarosa

**°GL:** Grado alcohólico expresado en %(v/v)

**AOAC:** Association of Official Agricultural Chemists (La asociación de las comunidades analíticas).

**ANOVA:** Análisis de varianza

**ml:** Mililitros.

**µm:** Micrómetro

**nm:** Nanómetro

**pH:** Potencial de hidrógeno.

**p/v:** Peso en función del volumen.

**g/L:** Gramos por litros

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue la obtención de bioetanol a partir del permeado de suero lácteo y la determinación de las condiciones óptimas para el proceso de fermentación. Para ello se realizó previamente un proceso de hidrólisis enzimática utilizando la enzima  $\beta$ -galactosidasa para desdoblar la lactosa presente en el suero en sus dos azúcares (glucosa y galactosa), y luego la fermentación utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La fermentación se realizó a temperaturas de: 20, 30 y 35°C, y tiempos de 48, 72 y 120 horas y luego se efectuó una destilación simple. Las variables de proceso temperatura y tiempo se analizaron en MINITAB 16 donde se obtuvo un p-valor de 0,042 por lo tanto existe un efecto significativo entre estos dos factores.

De acuerdo a los análisis estadísticos las condiciones óptimas para la fermentación fueron en base a la disminución de °Brix a 20°C por 48 horas con 2.1 °Brix, y de acuerdo al mayor grado alcohólico a 20°C por 120 horas con 1.15°GL.

**PALABRAS CLAVES:** suero lácteo, hidrólisis enzimática, bioetanol, lactosa, fermentación, destilación simple, grados alcohólicos, grados Brix, temperatura, tiempo.

## ABSTRACT

In the present project of investigation, the objective was the obtain bioethanol from permeate dairy serum and determine the optimal conditions for the fermentation process. For this, It has been made previously a enzymatic hydrolysis process, using the enzyme  $\beta$ -galactosidase to unfold the lactose present in the dairy serum in its two sugars (glucose and galactose), and then the fermentation using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The fermentation was performed out at temperatures of: 20, 30 and 35°C, and times of 48, 72 and 120 hours and then a simple distillation it was done. The variables of temperature process and time were analyzed in MINITAB 16 where was obtained, a p-value of 0.042 therefore exists a significant effect between these two factors.

According to the statistical analysis, the optimal conditions for fermentation were based on the decrease of °Brix, 20°C for 48 hours with 2.1°Brix, and according to the higher alcoholic strength content 20°C for 120 hours with 1.15°GL.

**KEYWORDS:** dairy serum, enzymatic hydrolysis, bioethanol, lactose, fermentation, simple distillation, alcoholic degrees, Brix degrees, temperature, time.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día existen altos índices de contaminación que ha puesto a todo un estado a exigir una producción limpia con alternativas que sean viables para aprovechar los subproductos obtenidos a partir de la fabricación de quesos u otros productos del sector lácteo. El lactosuero es el principal subproducto que genera mayor volumen de producción, y es considerado un ingrediente alimentario activo y funcional (De Castro et al., 2017).

A nivel mundial la producción de queso aumenta anualmente en un 3%, llegándose a generar cada vez más este subproducto, con un valor de producción de 130 millones de toneladas por año (Thanasiadis, Oskou, Anellaki, losseoglou, & Outinas, 2002). Lo cual representa un gran problema, ya que este es considerado como una fuente importante de contaminación ambiental no solo por su enorme tasa de producción global sino también por su alto contenido de materia orgánica, exhibiendo una demanda química de oxígeno (DQO) 60000-80000 ppm (Christensen, Kádár, Oleskowicz-Popiel, & Thomsen, 2011).

De acuerdo a la investigación que ha planteado Grijalva,(2019) en Ecuador existe una producción de 1'800.000 litros diarios de lactosuero , que se podrían utilizar para la producción de alcohol, en la industria cosmética o alimentaria, y con ello ayudamos a disminuir la contaminación.

Asimismo, el suero como producto alimenticio es de gran utilidad ya que posee aproximadamente un 55 % del total de nutrientes (lactosa, proteínas, vitaminas y minerales), y el no hacerlo ocasiona un gran desperdicio (Guerra, Castro, & Tovar, 2013).

El suero lácteo, al ser un reservorio de lactosa y otros nutrientes esenciales permiten el crecimiento de microorganismos, lo cual hace que sea una de las materias primas más potentes para la producción de diferentes bioproductos por medio de la biotecnología, y de esta manera generar nuevos productos con valor agregado (Panesar & Kennedy, 2012).

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo de investigación son el aprovechamiento del suero lácteo y establecer los parámetros de fermentación para determinar mediante análisis físico químico los volúmenes de alcohol producido para la obtención de bioetanol el cual está dirigido a las industrias lácteas que sería una oportunidad para el desarrollo sostenible.

A continuación, se describen los 3 capítulos. En el primer capítulo la revisión bibliográfica donde se da a conocer los conceptos específicos. En el segundo capítulo la metodología en la que se realizó todos los procedimientos con las variables establecidas para el estudio. En el tercer capítulo los resultados, conclusiones y recomendaciones de la investigación.

## **CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1. Lactosuero

Según lo establecido por la Norma INEN 2594 (2011) “Es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración de quesos, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada. La coagulación se produce mediante la acción de, principalmente enzimas del tipo del cuajo”.

## 1.2. Tipos de lactosuero

### 1.2.1. Suero dulce

El suero dulce se obtiene de la elaboración de quesos frescos, durante la coagulación enzimática que se da por el cuajo, principalmente por la renina a un pH de 6,5 (Villarreal, 2017).

### 1.2.2. Suero ácido

El suero ácido se produce a partir de la coagulación por una fermentación o adición de ácidos orgánicos de la caseína, donde existe una disminución del pH hasta 4.5 , además su contenido en lactosa se ve reducido a causa de la fermentación láctica (Álvarez, 2013).

En la **Tabla 1.** Se refleja la composición de los tipos de lactosuero que existen, donde el suero dulce posee mayor lactosa y proteína a diferencia del ácido.

**Tabla 1.** Composición de los tipos de lactosuero

<b>Componente (g/l)</b>	<b>Lactosuero dulce</b>	<b>Lactosuero ácido</b>
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Proteína	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactato	2.0	6.5
Cloruros	1.1	1.1

**Fuente:** Parra Huertas,( 2009)

**Elaborado por:** La Autora

## 1.3. Composición y características del lactosuero

El lactosuero contiene el 90% del volumen de la leche, además conserva nutrientes como son principalmente la lactosa(4,4-5%p/v), fuente proteína solubles (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v), minerales (calcio, fosforo, magnesio) y vitaminas (complejo B entre otros), sales minerales (8-10% de extracto seco), ácido láctico (0.05% p/v) y ácido cítrico(Das,



Raychaudhuri, & Ghosh, 2016a). Además tiene compuestos biológicamente activos y péptidos bioactivos, definidos como fragmentos específicos de proteínas (Carrasco & Guerra, 2010).

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas del lactosuero líquido

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min	Max.	
Lactosa (m/m)%	--	5.0	--	4.3	AOAC 984,15
Proteína láctea(m/m)(1) %	0.8	--	0.8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea(m/m) %	--	0.3	--	0.3	NTE INEN 12
Ceniza (m/m) %	--	0.7	--	0.7	NTE INEN 14
Acidez titulable (calculada como ácido láctico) %	--	0.16	0.35	--	NTE INEN 13
Ph	6.4	6.8	4.8	5.5	AOAC 973.41

Fuente: INEN 2594(2011)

Elaborado por: La Autora

### 1.3.1. Proteínas de lactosuero

Las proteínas tienen un alto valor nutricional y sus propiedades funcionales son versátiles en varios productos alimenticios. Representa el 20% de las proteínas totales de la leche, entre ellas las principales como la:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, y otras del suero que incluyen la inmunoglobulina, albumina sérica y lactoferrina, nutricionalmente son las más valiosa debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, especialmente el triptófano, cisteína, leucina, valina y lisina que son agentes importantes en el metabolismo. Tiene características únicas, como la solubilidad, un amplio rango de pH, siendo favorable con respecto a los aminoácidos esenciales, posee una funcionalidad diversa, que se convierte como un ingrediente ideal para formular una amplia gama de productos alimenticios (A. Kilara & M.Vaghela, 2018).

**Tabla 3.** Composición de las proteínas del lactosuero

Proteínas	Lactosuero%
$\beta$ -lactoglobulina	55- 65
$\alpha$ -lactoalbúmina	15- 25
Inmunoglobulina	10- 15
Seroalbúmina	5- 6
Lactoferrina	1-2

Fuente: Pedroza & Ramirez,( 2001)

Elaborado por: La Autora

### 1.3.2. Lactosa

La lactosa es un disacárido que se encuentran disponible en la leche de vaca a una concentración de 4.7 a 5.2% siendo su única fuente natural, ligeramente dulce, y es considerado menos soluble a diferencia de sus otros componentes, está compuesto de glucosa y galactosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) donde intervienen una D-(β)-galactopiranososa y una β-glucopirana (García, Quintero, & López, 2014).

A su vez puede ser producida por algunos microorganismos como son : *Kluyveromyces frágiles* y *lactis*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus stearothermophilus* y las bacterias lácteas (Cambero et al., 1998).

### 1.3.3. Lípidos

Los lípidos interactúan con las proteínas del lactosuero, la cual contiene aproximadamente el 0,5 y 8% de la materia grasa de la leche (Poveda, 2013).

### 1.3.4. Vitaminas

Contiene algunas vitaminas como el complejo B y otros como la tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, cobalamina y el ácido ascórbico (Poveda, 2013). En la siguiente tabla se describe las concentraciones que se encuentran presentes en el lactosuero donde se refleja con mayor cantidad el ácido pantoténico y ácido ascórbico.

**Tabla 4.** Concentraciones de vitaminas en el lactosuero

Vitaminas	Concentración (mg/ml)
Tiamina	0.38
Riboflavina	1.2
Ácido Pantoténico	3.4
Ácido Nicotínico	0.85
Piridoxina	0.42
Cobalamina	0.03
Ácido Ascórbico	2.2

Fuente : Poveda, (2013)

Elaborado por: La autora

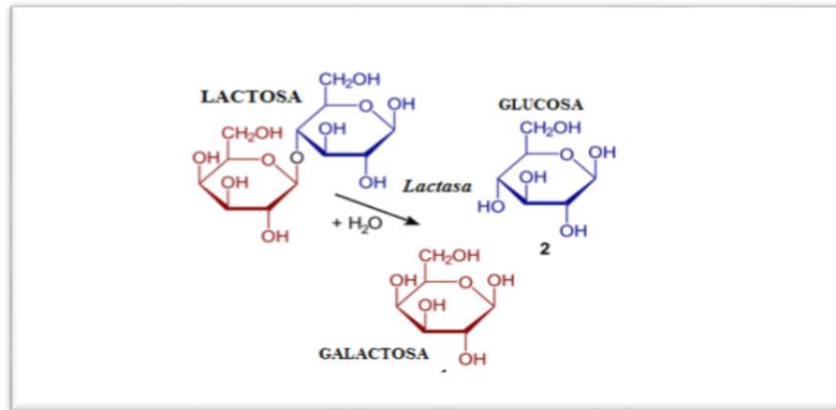
### 1.3.5. Minerales

El lactosuero posee minerales como son el calcio, fosforo, potasio, sodio y magnesio que se mantienen aun después de realizar un proceso como el de ultrafiltración (permeado), y tiene el 8-10% del extracto seco (Poveda, 2013).

## 1.4. Hidrólisis enzimática

Es un proceso que permite desdoblar la lactosa en sus dos componentes monosacáridos glucosa y galactosa, con el propósito de reducir su contenido, a pesar de su valor nutricional, tiene severas restricciones, y no puede ser metabolizada por algunas levaduras como es la

*Saccharomyces cerevisiae*, porque esta cepa carece de beta D-galactosidasa, y es por ello la importancia de la hidrólisis enzimática previo a los procesos de fermentación alcohólica como es la obtención de bioetanol donde se realizan a condiciones de temperatura y pH específicos (Ambrosi, Polenta, Gonzalez, Ferrari, & Maresca, 2016; Illanés, 2011).



**Figura 1 :** Estructura de la hidrólisis de la lactosa  
**Autor:** Antezana, (2015)  
**Elaborado por:** La autora

#### 1.4.1. Glucosa y galactosa

Son monosacáridos o también conocidos como azúcares libres que se encuentran formados por seis átomos de carbono con su fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ , ambos azúcares cumplen roles importante en la fermentación suministrando energía la cual permite que las levaduras interactúen, en el caso de la *Saccharomyces cerevisiae* tiene una preferencia por la glucosa, aunque la galactosa también se degrada junto a la glucosa (Coelho, Berry, & Rubio-Gozalbo, 2015).

#### 1.5. Aplicaciones industriales

El suero lácteo, es una fuente de proteínas, carbohidratos y tiene un alto valor nutricional, donde intervienen procesos físicos como evaporación, secado por aspersion y secado por congelación para convertir este subproducto en polvo, proteína de suero concentrada, proteína de suero aislada para poder ser utilizada como agente saborizante, gelificante, espesante, espumante dirigido para las industrias de pastelería, confitería y pueda ser remplazado por otro ingrediente. Además se puede añadir a la producción de fórmulas para niños, adultos mayores, bebidas deslactosadas destinadas a las personas intolerante a la lactosa, y la producción de bioetanol (De Castro et al., 2017; Królczyk, Dawidziuk, Janiszewska-Turak, & Sołowiej, 2016).

## 1.6. Proceso de la obtención del permeado

Es un proceso de ultrafiltración por membranas como WPC (Whey Protein Concentrate) que es utilizada para la separación de las proteínas del suero y como resultado obtener un producto con valor agregado, rico en lactosa agua y minerales con una concentración de 11% de sólidos totales (Regenhardt, 2010).

La ultrafiltración se ha incluido en procesamiento de la industria alimentaria que hace posible una mejor calidad en algunos productos lácteos, y se convierte en una parte esencial, su función principal es la separación y concentración de componentes mediante una membrana que permite el paso y a su vez retiene algunas sustancias acorde a tamaño del líquido filtrante (Atra, Gyula Vatai, Molnar-Bekassy, & Balint, 2005). Existen varios procesos de acuerdo al tamaño de partículas a continuación se menciona las que se utiliza.

**Tabla 5.** Tamaño de membranas

Procesos	Tamaño	Presión(bar)
Microfiltración (MF)	0.1-5 $\mu\text{m}$	0.1-3
Ultrafiltración (UF)	5-100 nm	1-10
Nano filtración (NF)	1-5 nm	10-50
Ósmosis Inversa (OI)	-----	10-100

Fuente: Camacho,( 2009)

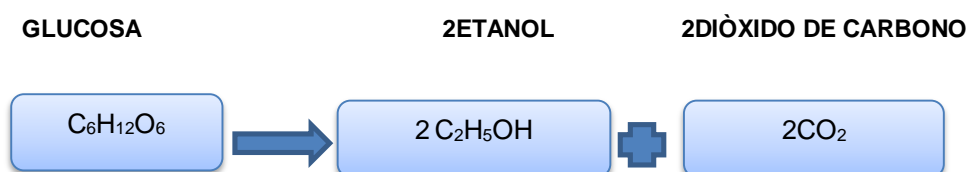
Elaborado por: La Autora

## 1.7. Aplicaciones industriales del permeado de suero

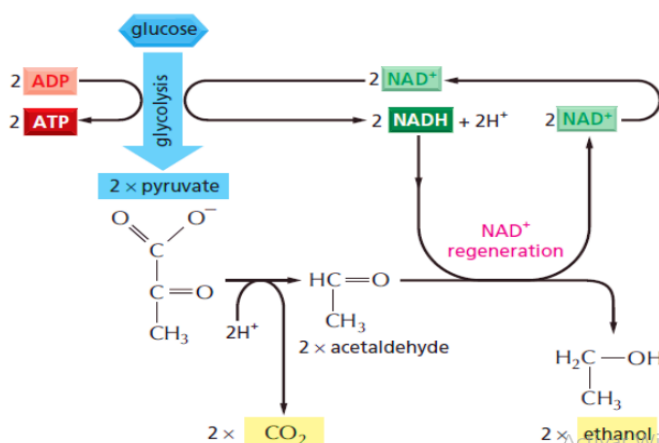
Existen algunas opciones para la utilización del permeado de suero que representan una parte importante en las industrias de procesamiento de alimentos como son: la producción de ácido láctico, producción de fermentos, obtención de jarabes edulcorantes por medio de la hidrólisis de la lactosa, obtención de proteínas unicelulares y la utilización del suero como fertilizante (Marella, Muthukumarappan, & Metzger, 2013).

## 1.8. Fermentación alcohólica

Es un proceso antiguo que se da por acción oxidativa de sustrato por la actividad de algunas levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, se describe la siguiente ecuación química:



La fermentación alcohólica se da a partir de ruta anaerobia donde utilizan levaduras y azúcares para ser transformados en alcohol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que se desprende de una forma gaseosa, existe una reducción de los compuestos NADH/NAD<sup>+</sup> y NADHP/NADP<sup>+</sup> por la vía de la glucólisis y se transforma en moléculas de ácido pirúvico(piruvato) y la producción de ATP(trifosfato de adenosina) siendo descarboxilado por la enzima piruvato a moléculas acetaldehído (CH<sub>3</sub>-CHO ),produciendo como producto final el etanol (Vargas Marín, 2017).



**Figura 2:** Esquema general de la fermentación alcohólica  
**Fuente :** López,( 2016)  
**Elaborado por:** López,( 2016)

## 1.9. Levaduras

Son un grupo de microorganismos que pertenecen a la división de hongos que se reproducen por gemación o fisión, tiene una gran importancia en la biotecnología porque son utilizados en procesos fermentativos (cerveza, sidra, vino y destilados) y panificación, y contiene varios microorganismos, que comparten relaciones simbióticas (Bekatorou, Psarianos, & Koutinas, 2006). Existen microorganismos para la producción de bioetanol a partir de la fermentación del suero lácteo, como son las cepas de *C. pseudotropicalis* y *Kluyveromyces* especies que son capaces de metabolizar directamente la lactosa (Das, Raychaudhuri, & Ghosh, 2016b).

### 1.9.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de microorganismos que es utilizada para los procesos industriales lo que permite producir hasta un 20%(v/v) en la fermentación alcohólica, tiene capacidad a desarrollarse en condiciones óptimas a un pH entre 4 a 6 y puede crecer en un rango de temperatura de 20 a 35 °C, sin embargo, no puede metabolizar la lactosa, debido a que obtiene energía desde la glucosa mediante un proceso de hidrólisis. Se están empleando diferentes enfoques para crear cepas diseñadas genéticamente que pueden

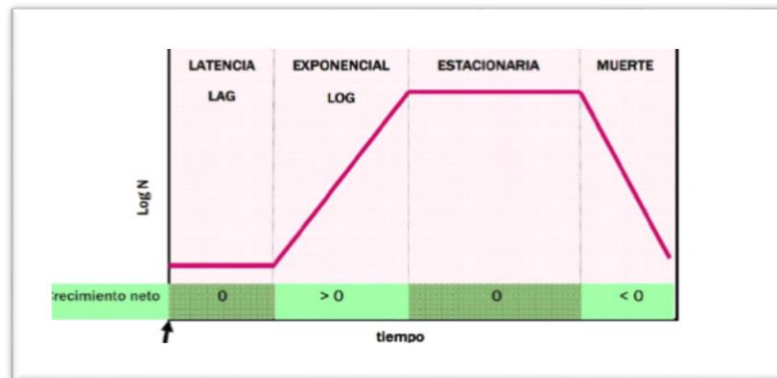
metabolizar la lactosa, esto se fomenta aún más debido a que *S. cerevisiae* es el microorganismo de elección más común en la fermentación a nivel industrial del alcohol, y su buena capacidad de rendimiento fermentativo, así como a su rapidez y tasa de crecimiento (Domingues et al., 2010; Suárez, Garrido, & Guevara, 2016).

### 1.9.2. *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces marxianus* ha sido considerada como la levadura más utilizada para la obtención de etanol porque es capaz de hidrolizar la lactosa, y se desarrollan a una temperatura entre 30-38°C con un rango de pH 4,5-5, obteniendo como resultados diferentes componentes como; etanol, glicerol, enzimas y proteína unicelular se puede aislar de varios productos lácteos y fermentaciones espontáneas utilizados en procesos con lactosuero; fermenta azúcares como: lactosa glucosa, xilosa, galactosa, sacarosa, rafinosa. Posee rasgos fenotípicos como la termotolerancia mejorada, la producción de enzimas  $\beta$ -galactosidasa e inulinas, *Kluyveromyces lactis* (Qi & Onwulata, 2011).

### 1.10. Ciclo de crecimiento de las levaduras

El ciclo de crecimiento de las levaduras permite determinar el desarrollo a través de diferentes fases con respecto al tiempo, se describen a continuación.



**Figura 3:** Curva de crecimiento de las levaduras

**Fuente:** Vargas Marín,( 2017)

**Elaborado por:** Vargas Marín,( 2017)

**Tabla 6: Fases de crecimiento de las levaduras**

<b>Fase de latencia</b>	En esta fase las levaduras se adaptan al medio de fermentación, sin aumentar su reproducción celular.
<b>Fase exponencial</b>	Las levaduras comienzan a crecer exponencialmente donde existe un máximo de 4 a 5 generaciones de células.
<b>Fase estacionaria</b>	Las levaduras es esta fase no se multiplican, permanece la población estacionaria y se activa por cierto tiempo. En esta fase se determina dos parámetros importantes como es la cosecha máxima y rendimiento.
<b>Fase de muerte</b>	Las levaduras disminuyen poco a poco, debido a que se transforman los últimos azúcares presentes del mosto, las células mueren y comienzan a excretar al medio todas los nutrientes que contiene.

**Fuente:**(Vargas Marín, 2017)

**Elaborado por:** La autora

## **1.11. Condiciones en el proceso de fermentación**

### **1.11.1. Temperatura**

La temperatura es uno de los factores importante para el proceso fermentativo en que alguna de las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* se reproducen a un rango específico de 30 a 35°C generando eficiencia en la velocidad de crecimiento, cuando se expone a temperaturas mayores afecta notablemente su crecimiento microbiano produciendo de inmediato su muerte (Nieto Galarza, 2009).

### **1.11.2. pH**

El pH es de gran influencia en el crecimiento microbiano para algunos microorganismos como son las levaduras que se desarrollan en un rango específico de 4.0 a 6.0 .Si existe un aumento de pH puede afectar su composición de la superficie microbiana y la floculación de la biomasa que involucran ácidos y bases (Fajardo & Sarmiento, 2007).

### **1.11.3. Grados Brix**

Los °Brix son utilizados en las industrias de alimentos para determinar los sólidos disueltos expresados en sacarosa, es importante la concentración de los azúcares antes de la fermentación porque puede afectar en la actividad microbiana (Nieto Galarza, 2009).

### **1.12. Etanol**

El etanol (alcohol etílico) es un líquido transparente e incoloro, volátil, biodegradable de baja toxicidad y causa poca contaminación ambiental, con un agradable olor característico llevado a una temperatura de ebullición de 78°C, es producido por un proceso de fermentación anaeróbica que intervienen levaduras que al alimentarse de los azúcares se transforman en alcohol, gas carbónico e energía alternativa (Qazizada, 2016).

### **1.13. Destilación simple**

La destilación simple es un método físico que se caracteriza por la separación de las sustancias más volátiles de las menos volátiles en una mezcla de varios líquidos alcohol y agua al ser sometidos al calor en un proceso de evaporación y mediante el refrigerante se da la condensación con una temperatura de ebullición de 78°C (Madrid Vicente Antonio, 2013).

### **1.14. Grado alcohólico**

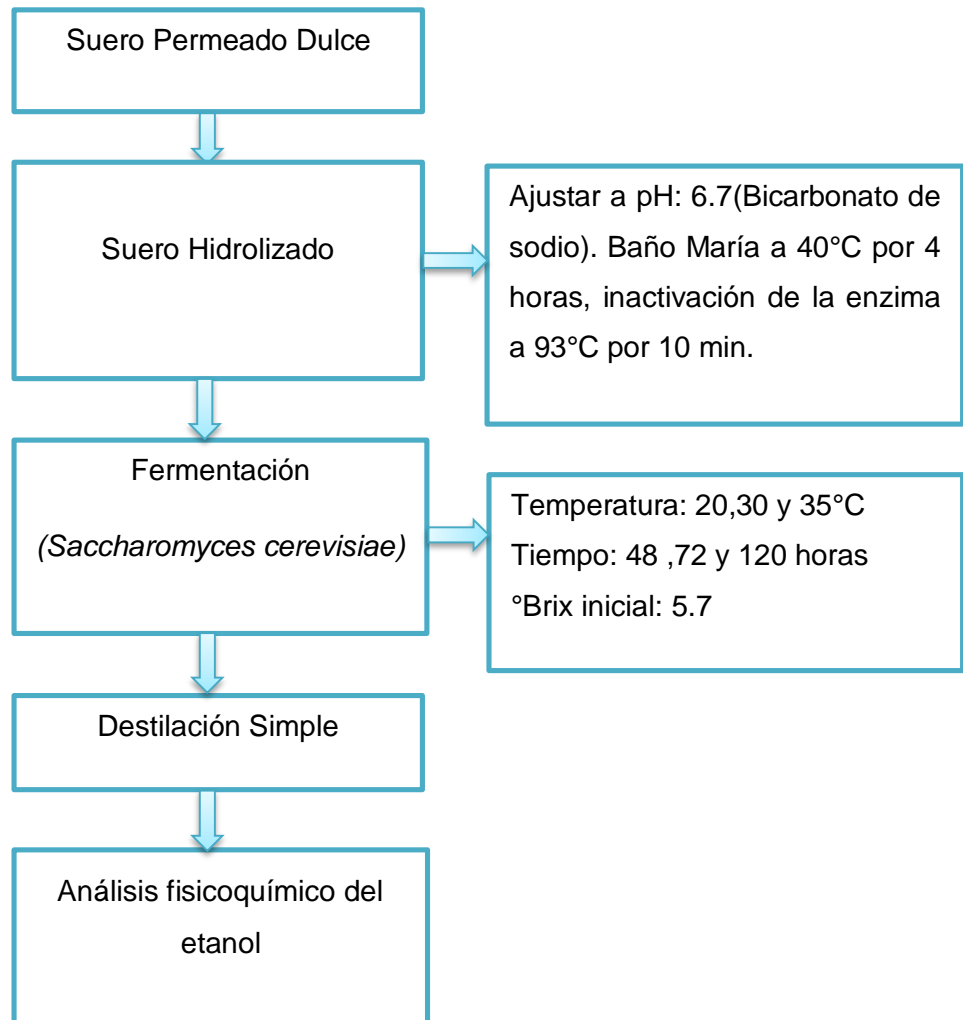
Según la Norma INEN 340(2016) “relación entre el volumen del alcohol etílico (etanol) contenido en una mezcla hidroalcohólica, medido a temperatura de 20 °C y el volumen total de la mezcla medido a la misma temperatura, expresado en fracción volumétrica (%)”.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Diagrama de la investigación

En el diagrama se describe la metodología que se realizó en el proyecto de investigación.



**Ilustración 1.**Diagrama de investigación  
**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora

La experimentación de este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio Docente de Tecnología de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

## 2.2. Materia Prima

La materia prima que se utilizó para el proyecto de investigación fue el suero permeado dulce obtenido de una empresa procesadora de productos lácteos que se encuentra ubicada en la provincia Pichincha, la cual cumplió los requisitos establecidos por la ficha técnica (**Anexo A**).

### 2.3. Proceso de hidrólisis

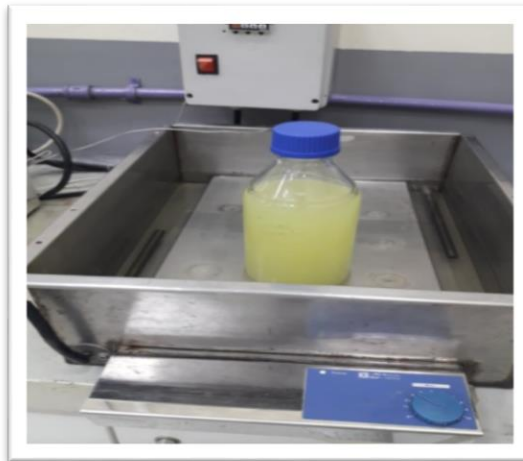
La hidrólisis de la lactosa se realizó debido a que la fermentación no podía interactuar con el proceso directo. Para ello primeramente se ajustó el permeado de suero a un pH de 6.7 haciendo uso del bicarbonato de sodio, luego se agregó la enzima  $\beta$  – galactosidasa (Mayalac 5000), y se colocó en baño maría con agitación(magnetos) a una temperatura de 40°C durante cuatro horas. A continuación, se describe las condiciones de la enzima.

**Tabla 7.** Condiciones de la enzima  $\beta$ –galactosidasa (Mayalac 5000).

Dosis de Ha-Lactase (ml/L)	Tiempo de Reacción(horas)	Temperatura de reacción(°C)	Grado de Hidrólisis(%)
0.36	4	40	80

Fuente: Ficha Técnica Mayalac 5000

Elaborado por: La autora



**Figura 4:** Hidrólisis en baño maría

Fuente: La autora

Elaborado por: La autora

Una vez realizado el proceso de hidrólisis, se da un tratamiento térmico a una de temperatura de 93°C por un lapso de 10 minutos con la finalidad de inactivar la enzima  $\beta$  –galactosidasa y así evitar que siga actuando.



**Figura 5:** Tratamiento térmico del suero hidrolizado  
**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora

## 2.4. Fermentación

Para la fermentación inicialmente fue necesario activar la levadura, lo cual se describe a continuación:

Se pesó 2.5 gramos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en 100 ml del sustrato (suero hidrolizado) a una temperatura constante de 30°C hasta la activación.

Luego de la activación se agrega 400ml de sustrato a un matraz Erlenmeyer y se cerró con un tapón y airlock para mantener las condiciones anaerobias, finalmente se deja fermentar; todo esto se repitió para los tratamientos ya establecidos a continuación.

**Tabla 8.** Parámetros de fermentación

Temperaturas(°C)	Tiempo(horas)
20	48
30	72
35	120

**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora



**Figura 6:** Fermentación en baños maría

**Fuente:** La autora

**Elaborado por:** La autora

## 2.5. Destilación

Se tomaron 250 ml de la muestra después de la fermentación a temperatura constante de 20°C durante 20 minutos, que fueron medidos en un balón de aforo, se vierten en el balón de destilación de 500ml adicionando unos núcleos de vidrio para que no se produzca un sobrecalentamiento. Se tomaron las debidas precauciones con la temperatura que no sobrepase los 78°C cuando comienza el proceso de destilación. En el recipiente recolector se añaden previamente 10ml de agua destilada para luego completar con un volumen de 250 ml y homogenizar para luego hacer la medición (INEN 340,2016).

Adicionalmente se realizó un blanco para verificar si existen pérdidas el proceso de destilado, el cual consiste en una solución agua–alcohol a 35°GL.



**Figura 7:** Proceso de la destilación simple

**Fuente:** La autora

**Elaborado por:** La autora

## 2.6. Análisis fisicoquímicos

### 2.6.1. Grados Brix

Se determinó según la AOAC 932.12 utilizando el refractómetro digital 30PX marca Mettler Toledo, previamente calibrado los resultados se expresa en °Brix (Horwitz & Latimer., 2005).



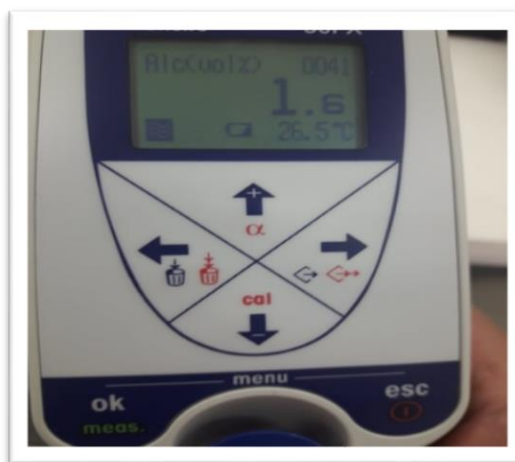
**Figura 8:** Medición de los °Brix

**Fuente:** La autora

**Elaborado por:** La autora

### 2.6.2. Grado alcohólico

Se determinó el grado alcohólico a cada tratamiento utilizando el equipo Mettler Toledo Densito 30 PX y se expresó en (vol%). Y en base a lo establecido por la INEN 340 (Anexo C).



**Figura 9:** Medición de °GL

**Fuente:** La autora

**Elaborado por:** La autora

## 2.7. Análisis estadístico

Para los análisis se realizó un diseño factorial con dos factores, tres niveles y tres réplicas, lo cual permitió el orden aleatorio de los tratamientos, y un análisis de varianza(ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa en las variables (temperatura y tiempo), todo esto se desarrolló haciendo uso del paquete estadístico MINITAB versión 16.

**Tabla 9.** Diseño aleatorio para los tratamientos empleados

<b>Orden Aleatorio</b>	<b>Orden de Corrida</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>
8	1	20	120
24	2	35	72
12	3	20	48
15	4	35	48
27	5	30	120
17	6	30	72
5	7	20	120
21	8	35	120
14	9	30	72
10	10	35	48
12	11	35	48
23	12	30	72
26	13	30	120
1	14	20	48
9	15	30	48
4	16	20	120
20	17	20	72
3	18	20	72
2	19	20	72
16	20	20	48
19	21	30	48
7	22	35	72
25	23	30	48
18	24	30	120
11	25	35	120
22	26	35	120
6	27	35	72

**Fuente:** La autora

**Elaborado por:** La autora

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 3.1. Resultados de la Investigación

En este capítulo se describirá los resultados que se obtuvieron en el desarrollo de la investigación donde se buscó las condiciones óptimas para la producción de bioetanol.

En el proceso de fermentación se realizaron pruebas con el permeado de suero directo de lo cual no se obtuvo los resultados esperados, debido a que la *Saccharomyces cerevisiae* no puede fermentar la lactosa porque carece de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Es por ello que luego en base a lo que menciona (Gabardo, Feix, Manuela, & Rosane, 2015) se desarrolló un proceso de hidrólisis enzimática para desdoblar la lactosa en glucosa y galactosa y de esta forma realizar la fermentación alcohólica.

El suero hidrolizado inició con 5.7°Brix en todos los tratamientos y para validar la funcionalidad del método de destilación simple se analizó un blanco como se mencionó en el apartado (2.5) obteniéndose una pérdida de 3.4% en el proceso de destilado.

A continuación, en la tabla 9 se pueden observar los valores de los °Brix finales luego de la fermentación, y el °GL del etanol obtenido.

**Tabla 10.** Resultados de °Brix y °GL de los tratamientos

<b>Tratamientos</b>	<b>°Brix Final</b>	<b>°GL</b>
1	2,1	1,2
2	2,1	0,9
3	2,6	0,7
4	2,2	1,4
5	2,4	1,4
6	2,6	1,4
7	2,4	1,4
8	2,6	0,9
9	2,6	1,9
10	2,2	0,7
11	2,9	0,8
12	2,7	0,3
13	2,2	1,2
14	2,7	0,8
15	2,6	1,5
16	2,6	0,5
17	2,4	0,4
18	2,5	0,6
19	2,5	0,6
20	2,6	0,7
21	2,6	0,3
22	2,6	0,4
23	2,2	0,3
24	2,4	0,5
25	2,6	0,7
26	2,4	0,7
27	2,6	0,3

**Fuente:** La autora

**Elaborado por:** La autora

### 3.2. Análisis de varianza de las variables de fermentación

Para determinar si los factores de estudio tienen efecto se analizó el análisis de varianza (ANOVA), donde se obtuvo un valor  $p \leq 0,042$ , lo que indica que la temperatura y tiempo son factores significativos durante el proceso de fermentación lo que se describe a continuación en la tabla 11.

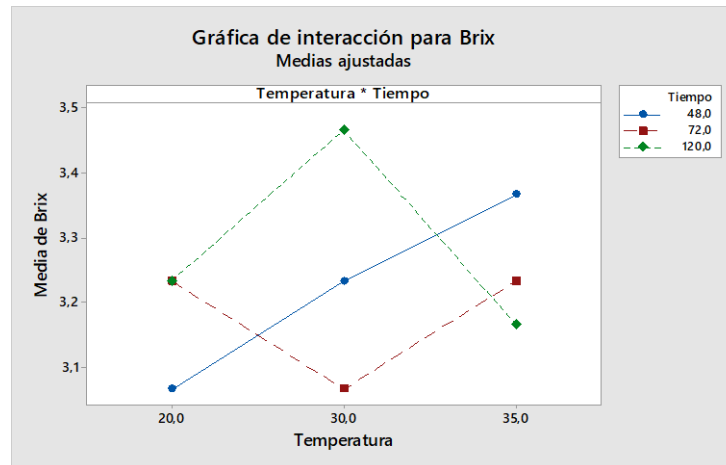
**Tabla 11.** Análisis de varianza de los factores aplicado

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,39630	0,04954	2,03	0,102
Lineal	4	0,09259	0,02315	0,95	0,460
Temperatura	2	0,03630	0,01815	0,74	0,490
Tiempo	2	0,05630	0,02815	1,15	0,338
Interacciones de 2 términos	4	0,30370	0,07593	3,11	0,042
<b>Temperatura* Tiempo</b>	<b>4</b>	<b>0,30370</b>	<b>0,07593</b>	<b>3,11</b>	<b>0,042</b>
Error	18	0,44000	0,02444		
Total	26	0,83630			

**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora

Según lo que menciona Nieto Galarza,( 2009). La temperatura y el tiempo son factores muy importantes en el proceso fermentativo ya que ejercen un marcado efecto sobre la velocidad metabólica de las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* y del producto final como es el etanol (Nieto Galarza, 2009).

### 3.3. Grados Brix en la fermentación



**Figura 10:** Valores de los °Brix después de la fermentación  
**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora

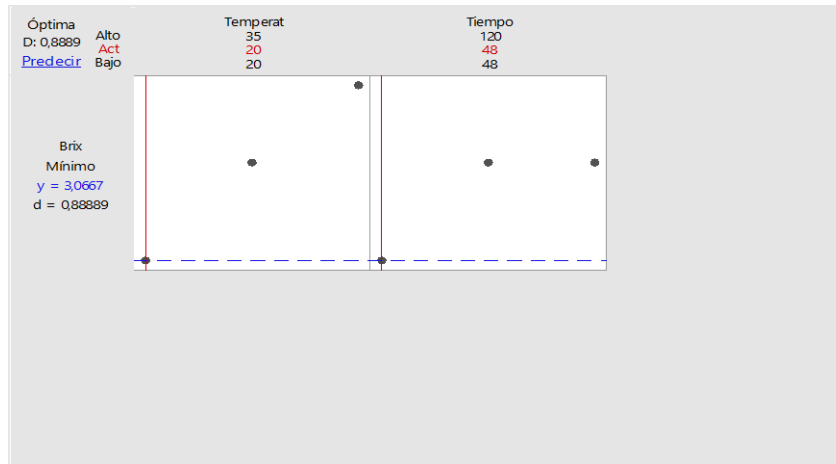
De acuerdo a la **figura 10** se observa que después del proceso de fermentación existe una mayor disminución de °Brix a temperatura de 20°C y 48 horas.

Lin et al., (2014) indica que la fermentación alcohólica se da a temperaturas de 20 a 35°C donde es considerado un rango específico para que se puedan desarrollar las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales consumen todos los azúcares y nutrientes disponibles del sustrato para transformar a etanol y CO<sub>2</sub>.

A continuación, se realizó una optimización de los parámetros de fermentación, de acuerdo a los resultados que reflejan el menor °Brix para corroborar con lo mencionado.

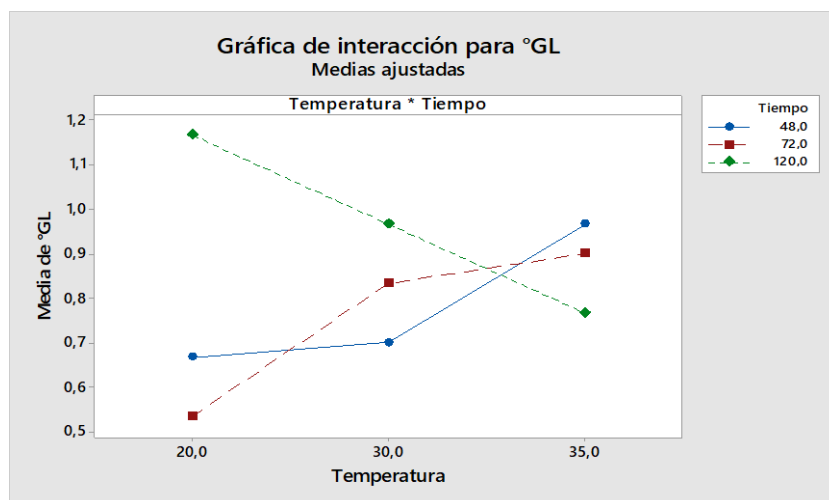
### 3.4. Optimización de los °Brix

Los parámetros óptimos para la obtención del °Brix son a una temperatura de 20° C y 48 horas.



**Figura 11:** Optimización de los °Brix en la fermentación  
**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora

### 3.5. °GL de etanol



**Figura 12:** Valores de los °GL después del proceso de destilación  
**Fuente:** La autora  
**Elaborado por:** La autora

La Figura 12 muestra que a 20°C y 120 horas existe mayor concentración de °GL, esto pudo haber ocurrido debido a que las bajas temperaturas favorecen a una mayor concentración de etanol, porque las vías metabólicas con estas condiciones funcionan a una velocidad menor, evitando la saturación en las primeras fases de la fermentación como ocurre a altas temperaturas que además de etanol se forman otros compuestos como el glicerol producto de la fermentación gliceropirúvica (Nieto Galarza, 2009).

## **CONCLUSIONES**

- Se logró obtener bioetanol a partir de suero lácteo, contribuyendo esta forma al desarrollo sostenible en la industria alimentaria.
- Las temperaturas de 20,30 y 35 y tiempo 48,72 y 120 horas fueron las variaciones utilizadas para determinar las condiciones óptimas de fermentación del permeado de suero lácteo.
- Se determinaron como condiciones óptimas para la fermentación; la temperatura de 20°C y 48 horas en base al °Brix mínimo con 2.1°Brix, y 20°C y 120 horas de acuerdo al mayor grado alcohólico con 1.15°GL.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar para estudios posteriores la levadura *Kluyveromyces marxianus* para obtener concentraciones mayores de etanol, y así mismo evitar procesos de hidrólisis enzimática, con la finalidad de ser utilizado en un campo amplio de la industria alimentaria.
- Realizar pruebas de fermentación en un biorreactor, el cual permitirá tener un control de todo el proceso de fermentación.
- Analizar otros análisis fisicoquímicos que se consideran importantes en el proceso de fermentación como es la influencia del pH y la concentración del sustrato.

## BIBLIOGRAFÍA

- A. Kilara, & M.Vaghela. (2018). Whey proteins. *Proteins in Food Processing*, 93–126.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
- Alvarez, M. (2013). Caracterización fisicoquímica diferentes tipos lactosueros producidos en Colanta, 1–42.
- Ambrosi, V., Polenta, G., Gonzalez, C., Ferrari, G., & Maresca, P. (2016). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 294–301.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.009>
- Antezana, C. I. (2015). *Efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa en el perfil de textura de queso fresco normal y bajo en grasa*. Universidad Nacional Agraria la Molina. Retrieved from [http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1789/Q04\\_A558\\_TBAN\\_UNALM.pdf?sequence=1](http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1789/Q04_A558_TBAN_UNALM.pdf?sequence=1)
- Atra, R., Gyula Vatai, Molnar-Bekassy, E., & Balint, A. (2005). Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67(3), 325–332.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., & Koutinas, A. A. (2006). Production of Food Grade Yeasts, 44(3), 407–415.
- Camacho, M. (2009). *Obtención de un concentrado proteico del suero de leche de vaca utilizando tecnología de membranas*. Escuela Politécnica Nacional. Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1657>
- Cambero, M. I., Rodriguez, Fernández, L. Á., García, M. L. S., Minguillón, G. D. G. de F., Perales, L. de la H., & Selgas, M. D. C. (1998). *Tecnología bioquímica y de los Alimentos*. (O. Juan, Ed.). Madrid.
- Carrasco, C. A., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos Whey as a source of bioactive peptides. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 23(1), 42–49.
- Christensen, A. D., Kádár, Z., Oleskowicz-Popiel, P., & Thomsen, M. H. (2011). Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*.



- Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 283–289.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0771-0>
- Coelho, A. I., Berry, G. T., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2015). Galactose metabolism and health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(4), 422–427.  
<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000189>
- Das, M., Raychaudhuri, A., & Ghosh, S. K. (2016a). Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 833–846. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.100>
- Das, M., Raychaudhuri, A., & Ghosh, S. K. (2016b). Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 833–846. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.100>
- De Castro, R. J. S., Domingues Fontenele, M. A., Ohara, A., Okuro, P. K., dos Santos, J. G., Brexó, R. P., & Sato, H. H. (2017). Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Structure*, 14(May), 17–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>
- Domingues, L., Guimarães, P. M. R., Oliveira, C., Domingues, L., Guimarães, P. M. R., & Oliveira, C. (2010). for lactose / whey fermentation Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose / whey fermentation, 1018(May).  
<https://doi.org/10.4161/bbug.1.3.10619>
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Gabardo, S., Feix, G., Manuela, P., & Rosane, P. K. (2015). Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1498-0>
- García, M., Quintero, R., & López, A. (2014). *Biotecnología Alimentaria*. México.
- Grijalva, J. P. (2019). Alcohol a base de suero de leche, una alternativa en análisis para Ecuador. Retrieved from <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/alcohol-suero-leche-analisis->

ecuador?fbclid=IwAR3wedko8gC7ke\_4c61MnOBBvAyuy1U1e2kYNIX5Dlj\_N6  
hytOQUdggYvYM

Guerra, Á. V. A., Castro, L. M. M., & Tovar, & A. L. Q. (2013). Utilization of whey as a source of nutritional energy to minimize the problem of environmental pollution. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.05.023>

Horwitz, W., & Latimer., G. W. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*.

Illanés, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6), 1–28. <https://doi.org/10.2225/vol14-issue6-fulltext-11>

INEN (2011) 2594. Suero de leche líquido. Requisitos. Quito - Ecuador. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

INEN (2016) 340. Bebidas Alcohólicas. Determinación del contenido de alcohol etílico. Método del alcoholímetro de vidrio grado alcohólico. Quito - Ecuador. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Królczyk, J. B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., & Sołowiej, B. (2016). Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), 157–165. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0052>

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2014). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>

López, P. V. (2016). *Caracterización metabólica de la tolerancia de levaduras al estrés por compuestos fenólicos y azufrados*. Instituto Politécnico Nacional.

Lucero Méndez, P. D. (2015). *Efecto del uso de levaduras y concentración de °Brix en las características fisicoquímicas y sensoriales de vino de fresa con miel*. Zamorano. Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4636/1/AGI-2015-025.pdf>

Madrid Vicente Antonio. (2013). *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* (Primera Ed). España.

- Marella, C., Muthukumarappan, K., & Metzger, L. E. (2013). Application of Membrane Separation Technology for Developing Novel Dairy Food Ingredients, *4*(9). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000269>
- Nieto Galarza, H. (2009). *Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando Saccharomyces cerevisiae y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtención de etanol*. Escuela Politécnica del Ejército.
- Panesar, P. S., & Kennedy, J. F. (2012). Biotechnological approaches for the value addition of whey, *32*(July 2011), 327–348. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.640624>
- Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *62*, 4967–4982. <https://doi.org/10.15446/rfnam>
- Pedroza, J., & Ramirez, G. (2001). *Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en el sistema continuo*. Universidad de la Sabana.
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, *40*(4), 397–403. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>
- Qazizada, M. E. (2016). Design of a batch stirred fermenter for ethanol production. *Procedia Engineering*, *149*(June), 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.684>
- Qi, P. X., & Onwulata, C. I. (2011). Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(9), 4668–4675. <https://doi.org/10.1021/jf2011744>
- Regenhardt, S. (2010). *Estudio de la inmovilización de la β-Galactosidasa para la reutilización de la lactosa del suero de quesería*. Universidad Nacional Litoral.
- Suárez, C., Garrido, N. A., & Guevara, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Instituto Cubano de Investigaciones Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar (ICIDCA)*, *50*(1), 20–28. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>

Thanasiadis, I. A., Oskou, D. B., Anellaki, M. K., Iosseoglou, V. K., & Outinas, A. A. K. (2002). Whey Liquid Waste of the Dairy Industry as Raw Material for Potable Alcohol Production by Kefir Granules, 7231–7234.


Vargas Marín, X. C. (2017). *Evaluación de la producción de etanol a partir del lacto suero a nivel de biorreactor (bioflo 110) utilizando Kluyveromyces marxianus y Kluyveromyces lactis como agentes fermentativos*. Universidad de la Salle.

Villarreal, B. (2017). Desarrollo en planta piloto de una bebida de lacto suero y fruta natural para adultos mayores, 172.

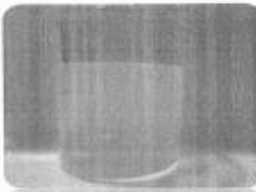
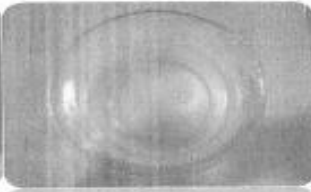
## **ANEXOS**

## Anexo A.-Ficha técnica del permeado de leche

Activar

	<b>FICHA TÉCNICA</b>	Versión: 01 Vigencia: 2017 Páginas: 1 de 2
<b>PERMEADO DE LECHE (30% S.T)</b>		

**1.- Nombre del producto:** PERMEADO DE LECHE

**2.- Características del producto:**

**2.1.- Parámetros Físico-Químicos:**

Parámetros	Unidad	Mínimo	Máximo
Temperatura	°C	-	8
Acidez	°D	6	10
Grasa	%	-	0.10
Proteína	%	0.15	0.25
Lactosa	%	3.5	4.9
Sólidos No grasos	%	5.10	5.50
Sólidos totales	%	5.2	5.6
pH	-	6.4	6.9
Alcohol	%	78	82
Ebullición	-	Negativo	Negativo
Crioscopia	m°C	-536	-480
Agua	%	0.00%	8.0%
Brix	°	5	9
Densidad	g/ml	1.020	1.024
Peroxido	ppm	0	0

Fuente: Especificaciones internas de laboratorio.

**2.2.- Parámetros Sensoriales:**

Parámetros	Característica
Color	Amarillo verdoso.
Olor	Olor característico, libre de olores extraños.
Sabor	Característico.

**2.3.- Parámetros Microbiológicos:**

Parámetros	Unidad	Valor	METODO
Coliformes Totales	ufc/g	10	Petrifilm
E.Coli	ufc/g	<10	Petrifilm
Mesófilos	ufc/g	30000	Petrifilm
Salmonella	ufc/g	Ausencia	Petrifilm

Fuente: NTE INEN 10:2012 LECHE PASTEURIZADA - REQUISITOS

### INFORME DE COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

Fecha de Informe:	19/07/2016	Orden:	4631	N° de Informe:	3862-16	Página:	1/4
-------------------	------------	--------	------	----------------	---------	---------	-----

<b>INFORMACIÓN DEL CLIENTE:</b>	
Nombre:	REYBANPAC REY BANANO DEL PACIFICO C.A.
Dirección:	AV. CARLOS JULIO AROSEMENA KM 2.5 JUNTO A "MI COMISARIATO"
Teléfono:	7200670

<b>DATOS DE LA MUESTRA:</b>					
Nombre del producto:	PURMEADO DE LECHE				
Lote:	16181	Fecha de Lab.	29/06/2016	Fecha de Esp.	06/07/2016
Contenido Declarado:	1000 cm3	Porción:	240 cm3	Fecha de recepción:	04/07/2016
Código de Laboratorio:	PL-FN-243-04-07-10	Conservación:	Refrigeración 5°C	Muestreo:	Realizado por el cliente

<b>RESULTADOS</b>				
Fecha de Análisis:	06/07/2016	N° Página R 30-S.10:	AAS-1257/FN-3631/HPLC-1179	
Condiciones Ambientales:	Temperatura:	20-30°C	Humedad Relativa:	45-65%

Composición Nutricional			
Parámetros	Unidad	Resultados	Método de Referencia
Sólidos Totales	g%	5,44	AOAC 19TH 925.53
Cenizas	g%	0,51	AOAC 19TH 945.46
Grasa total	g%	0,044	AOAC 19TH 989.05
Proteína (N x 6,25)	g%	0,09	AOAC 19TH 991.20
Carbohidratos totales por diferencia	g%	4,89	CÁLCULO
Energía	kcal/100 g	19,96	MMQ-114
Energía	kJ/100 g	83,63	MMQ-114
Fibra dietaria	g%	0,00	AOAC 19TH 985.29
Azúcares totales por inversión	g%	3,30	MMQ-108
Calcio	mg%	27,39	MMQ-AAS-18
Hierro	mg%	0,00	MMQ-AAS-15
Sodio	mg%	33,29	MMQ-AAS-22
Potasio	mg%	174,67	MMQ-HPLC-03
Zinc	mg%	< 0,025	MMQ-AAS-33
Cobre	mg%	= 0,075	MMQ-AAS-13
Magnesio	mg%	3,01	MMQ-AAS-26
Colesterol	mg%	5,17	MMQ-HPLC-02
Ácidos grasos saturados	g%	0,023	MMQ-HPLC-09
Ácidos grasos mono insaturados	g%	0,021	MMQ-HPLC-09
Ácidos grasos poli insaturados	g%	0,00	MMQ-HPLC-09
Omega 3	g%	0,00	MMQ-HPLC-09
Omega 6	g%	0,00	MMQ-HPLC-09
Ácidos grasos trans	g%	0,00	MMQ-HPLC-09
Vitamina A	mg%	0,00	MMQ-HPLC-04
Vitamina C	mg%	0,00	MMQ-HPLC-07
Tiamina (Vit. B1)	mg%	0,065	MMQ-HPLC-05
Riboflavina (Vit. B2)	mg%	0,12	MMQ-HPLC-05
Niacina (Vit. B3)	mg%	< 0,025	MMQ-HPLC-05
Piridoxina (Vit. B6)	mg%	0,032	MMQ-HPLC-05
Ácido Fólico (Vit. B9)	mg%	< 0,05	MMQ-HPLC-05

Información Nutricional reportada de acuerdo a los requisitos de la Norma INEN 1334-2:2011.

Nota 1: La muestra analizada tuvo una densidad de 1,0251 g/cm<sup>3</sup>

## Anexos B.-Ficha técnica de la enzima Mayalac 5000

FICHA TÉCNICA	
<b>MAYALACT 5000</b>	
<b>Versión:</b> 01	<b>Página:</b> 4 de 6

Fig. 4 Proceso UHT - filtración

### 6. Dosis

La dosis requerida depende de un número de condiciones, incluyendo:

- Grado deseado de hidrólisis
- Condiciones de proceso
- Fuerza de la formulación del producto

Las dosis típicas se muestran en la Tabla 1.

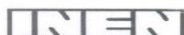
Tabla 1. Dosis de enzima recomendada para diferentes condiciones de procesos con lactasa

DOSIFICACIÓN DE MAYALACT 5000 (ml/L)	Tiempo de reacción (horas)	Temperaturas de reacción (°C)	Grado de Hidrólisis (%)
0.12 - 0.2	10	5	20
0.04 - 0.08	24	5	20
0.2 - 0.36	1	30	20
0.04 - 0.08	4	30	20
0.08 - 0.16	1	40	20
0.02 - 0.04	4	40	20
0.4 - 0.24	10	5	50
0.2 - 0.28	24	5	50
0.84 - 1.24	1	30	50
0.2 - 0.32	4	30	50
0.36 - 0.56	1	40	50
0.08 - 0.16	4	40	50
1.4 - 2.16	10	5	80
0.6 - 0.88	24	5	80
2.76 - 4.16	1	30	80
0.68 - 1.04	4	30	80
1.16 - 1.76	1	40	80
0.28 - 0.44	4	40	80



## Anexos C.- Norma INEN 340

CDU: 663.5  
ICS: 3131



AL 04.02-302

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	BEBIDAS ALCOHOLICAS. DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHOLICO.	NTE INEN 340:1994 Primera revisión 1994-10
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta Norma establece el método para determinar el grado alcohólico en bebidas alcohólicas.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. ALCANCE</b></p> <p>2.1 Esta Norma se aplica a bebidas alcohólicas destiladas, alcohol etílico, materias primas y subproductos alcohólicos.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. DEFINICIONES</b></p> <p><b>3.1 Grado alcohólico.</b> Es el volumen de alcohol etílico, expresado en centímetros cúbicos, contenido en 100 cm<sup>3</sup> de bebida alcohólica, a una temperatura determinada.</p> <p><b>3.2 Grado alcohólico.</b> Es el grado de una mezcla hidroalcohólica pura, indicado por el alcoholímetro centesimal de Gay Lussac en una temperatura diferente a la de referencia. La lectura de un grado aparente debe darse siempre indicando la temperatura a la cual dicha lectura fue tomada. También se considera grado aparente la lectura alcoholimétrica de una mezcla que no sea pura, debido a la adición de sustancia que altera la densidad de la mezcla. En este caso, para determinar el grado alcohólico real, debe someterse a un proceso de destilación, hasta obtener una mezcla hidroalcohólica pura.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. METODO DE ENSAYO</b></p> <p><b>4.1 Resumen</b></p> <p>4.1.1 El método consiste en efectuar una destilación simple de la bebida alcohólica, llevar a un volumen inicial con agua destilada y determinar en el destilado hidroalcohólico, el grado alcohólico volumétrico, por alcoholimetría.</p> <p><b>4.2 Instrumental</b></p> <p>4.2.1 Alcoholímetro de Gay-Lussac, calibrado a 15°C y 20°C graduados en décimas de grado alcohólico, de calidad certificada.</p> <p>4.2.2 Termómetro graduado en décimas de grado Celsius (centígrados).</p> <p>4.2.3 Matraz volumétrico, de 250 cm<sup>3</sup>.</p> <p>4.2.4 Probeta de capacidad y diámetro adecuados para evitar rozamiento con el alcoholímetro.</p> <p>4.2.5 Aparato para destilación (ver figura 1), compuesto por:</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <p>DESCRIPTORES: Bebidas espirituosas, alcoholes, aguardientes, licores, fermentación, destilación, infusión, percolación, maceración, método de ensayo.</p>		

- a) matraz de destilación, de 1000 cm<sup>3</sup>, con fondo redondo,
- b) malla de asbesto,
- c) fuente eléctrica de calentamiento,
- d) tubo de vidrio delgado, de aproximadamente 6 mm de diámetro interno y de dimensiones 300 x 300 mm x 150 mm,
- e) refrigerante de Liebing de longitud igual o mayor a 400 mm,
- f) tubo de vidrio adecuado para dirigir el destilado al recipiente colector,
- g) matraz volumétrico, de 250 cm<sup>3</sup>, y
- h) baño de agua con hielo, en el que debe sumergirse el matraz volumétrico.

4.2.6 Baño de agua, con temperatura constante de  $15 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , ó  $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , según el caso, de profundidad igual o superior a 30 cm.

4.2.7 Núcleos de ebullición.

#### 4.3 Preparación de la muestra.

4.3.1 Para productos alcohólicos que contienen extracto seco, debe destilarse previamente la muestra, y determinar en el destilado el grado alcohólico volumétrico utilizando el alcoholímetro Gay-Lussac.

4.3.2 Lavar cuidadosamente el equipo para destilación con agua destilada y proceder a armarlo.

4.3.3 Enjuagar el matraz con una porción de la muestra de bebida alcohólica, llenarlo con la muestra hasta sobrepasar la marca de 250 cm<sup>3</sup> y tapar el matraz.

4.3.4 Colocar el matraz en el baño de agua, a temperatura constante de  $15^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ó  $20^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , según el caso, durante 20 minutos y retirar el exceso de muestra que sobrepasa la marca, utilizando una pipeta, hasta obtener el volumen exacto de 250 cm<sup>3</sup>.

4.3.5 Transferir el contenido al matraz del aparato de destilación y lavar con tres porciones de 10 cm<sup>3</sup> de agua destilada, recogiendo el agua de lavado en el mismo matraz del aparato de destilación. Añadir núcleos de ebullición.

4.3.6 Destilar lentamente la muestra, recogiendo el condensado en un matraz volumétrico de 250 cm<sup>3</sup> al que se añaden previamente 10 cm<sup>3</sup> de agua destilada, hasta que se haya recogido 220 cm<sup>3</sup> aproximadamente.

4.3.7 Colocar el matraz en un baño de agua a temperatura constante  $15^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ó  $20^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , según el caso, durante 20 minutos y luego añadir cuidadosamente agua destilada a  $15^{\circ}\text{C}$  ó  $20^{\circ}\text{C}$ , según el caso, hasta completar el volumen de 250 cm<sup>3</sup> y homogeneizar.

#### 4.4 Procedimiento

4.4.1 Efectuar la determinación en la misma muestra preparada por duplicado.

4.4.2 Colocar la muestra preparada en la probeta perfectamente limpia y seca.

4.4.3 Limpiar y secar cuidadosamente el alcoholímetro y el termómetro e introducirlos suavemente en la probeta con la muestra, manteniéndolos así durante 10 minutos

(Continúa)

4.4.4 Agitar ligeramente para igualar la temperatura del sistema y leer la temperatura.

4.4.5 Dejar en reposo hasta que desaparezcan las burbujas de aire que se forman en el seno del líquido y efectuar la lectura en el alcoholímetro, considerando el nivel real del líquido y no la elevación del menisco, utilizando una lupa, si fuera necesario.

4.4.6 Corregir el grado alcohólico aparente medido a 15°C, utilizando la tabla 1.

4.4.7 Corregir el grado alcohólico aparente medido a 20°C utilizando la tabla 2.

4.4.8 Corregir el grado alcohólico aparente Intermedio, por interpolación.

#### 4.5 Errores de método

4.5.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder del 0,2 GL; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

#### 4.6 Informe de resultados.

4.6.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los resultados de la determinación, con aproximación a una centésima.

4.6.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma, o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

4.6.3 Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

*(Continúa)*