

Producción de bioetanol a partir de suero de leche

Fabiola Sandoval-Salas*, Anayeli Rendón-Ávila, Antonio Janoary Alemán-Chang, Carlos Méndez-Carreto, Christell Barrales-Fernández

Laboratorio de investigación, Tecnológico Nacional de México, Perote, Veracruz, México

* Autor de correspondencia: investiga.itspe@mail.com

Energías Renovables (Desarrollo de procesos de generación de bioenergéticos).

Resumen: Durante la producción de queso, se obtiene una gran cantidad de lactosuero como residuo (Gómez et al., 2019; Álvarez-Delgado y Otero-Rambla 2020). El suero de leche es un material rico en proteínas de alto valor alimentario, como β -lactoglobulinas, α -lactalbuminas, glycomacropeptidos, inmunoglobulinas y proteasa-peptona (Krissansen, 2013; Wijayanti et al., 2014). Alrededor del 50% del suero producido en el mundo no recibe algún tipo de tratamiento para su recuperación, principalmente porque los pequeños y medianos productores no pueden adquirir alguna tecnología para aportar valor añadido a este residuo (Tavares y Malcata, 2016). Se han desarrollado numerosas investigaciones para el aprovechamiento del suero de leche, en la producción de biocombustibles, como etanol, butanol, glicerol, metano, hidrógeno, entre otros. También se ha investigado su potencial para la obtención de ácidos grasos de cadena corta, con valor comercial (Bourda et al., 2017; Ramos y Silva, 2017). En el presente estudio, se evaluaron dos tipos de pretatamiento del lactosuero (desproteínizado térmico y químico), de los cuales los tratamientos térmicos obtuvieron los mejores rendimientos en la producción de etanol, siendo de 25.28 g / L de suero, utilizando *Kluyveromyces marxianus* en la fermentación; para lactosueros ácidos sin pretratamiento se obtuvieron 22.12 g / L de suero, con *Kluyveromyces marxianus*, y utilizando una hidrólisis enzimática y fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, se obtuvieron rendimientos de 18.96 g / L de suero, con tratamiento de desproteínizado térmico.

Palabras clave: producción bioetanol, suero de queso, fermentación, pretratamiento, hidrólisis

Bioethanol production from cheese whey

Abstract: During cheese production, a high volume of cheese whey are obtained (Gómez et al., 2019; Álvarez-Delgado and Otero-Rambla 2020). Cheese whey is rich in proteins of high nutritional value, such as β -lactoglobulins, α -lactalbumins, glycomacropeptides, immunoglobulins and protease-peptone (Krissansen, 2013; Wijayanti et al., 2014). Around 50% of the cheese whey produce around world have does not receive some type of treatment. Small and medium producers cannot acquire any technology to add value to this waste (Tavares y Malcata, 2016). Different investigations about exploitation of cheese whey have been developed. Cheese whey can be use in the biofuels production, such as ethanol, butanol, glycerol, methane, hydrogen, mainly. Besides, cheese whey has commercial value by the content of short chain fatty acids (Bourda et al., 2017; Ramos y Silva, 2017). In the present study, two types of pretreatment in cheese whey were evaluated (thermal and chemical deproteinized). The thermal treatments obtained higher yields in ethanol production (25.28 g per liter of cheese whey), in fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. In the case of acid cheese whey without pretreatment, we obtained 22.12 g of ethanol per liter of cheese whey. In the enzymatic hydrolysis and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, better yields were obtained in the thermal deproteinized pretreatment (18.96 g per liter of cheese whey).

Keywords: bioethanol production, cheese whey, fermentation, pretreatment, hydrolysis

Introducción

La presión ejercida por los altos niveles de contaminación ha propiciado un incremento en la investigación que permita la producción limpia de bienes y servicios y el aprovechamiento de los subproductos generados (Koutinas et al. 2009; Carvalho et al., 2013). Uno de los principales residuos generados por la industria láctea es el suero de leche, cuya producción mundial anual es de 160 millones de toneladas, con un crecimiento anual del 1-2% (Dragone et al., 2009; Ramírez Navas, 2012, Das et al., 2015; Álvarez-Delgado y Otero-Rambla, 2020). En algunos casos, este suero se utiliza directamente en la alimentación del ganado pero la mayor parte se vierte en los cuerpos de agua o directamente en el suelo, causando daño ambiental ya que contiene altas concentraciones de sustancias orgánicas disueltas (Pintado et al., 2001; Mukhopadhyay et al., 2003).

Hoy en día sólo alrededor del 50% del suero producido en el mundo recibe algún tipo de tratamiento para su recuperación, principalmente porque los pequeños y medianos productores no pueden adquirir alguna tecnología para aportar valor añadido a este residuo (Tavares y Malcata, 2016). Uno de los principales productos recuperados del suero de queso es la lactosa, que puede utilizarse como ingrediente en la producción de diversos productos (fórmula infantil,

pan, dulces, carnes, etc.). Sin embargo, cuando este azúcar se fermenta junto con otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos, es posible obtener una amplia variedad de subproductos (Soriano-Pérez et al., 2012, Hadiyanto et al., 2014, Valentino et al., 2015, Amado et al., 2016, Remon et al., 2016; Álvarez-Delgado y Otero-Ramblar, 2020).

El uso de la lactosa del suero de leche puede ser económicamente competitivo en relación a otros sustratos usados actualmente tales como la caña de azúcar o el almidón de maíz (Kádár et al., 2011, Sarris y Papanikolaou, 2016). Adicionalmente, este producto presenta la ventaja de que no compite con productos alimentarios.

El suero de leche es un material rico en proteínas de alto valor alimentario tales como β -lactoglobulinas, α -lactalbuminas, glycomacropeptidos, inmunoglobulinas and proteasa-peptona (Krissansen, 2013; Wijayanti et al., 2014). Las proteínas obtenidas del suero pueden ser utilizadas por seres humanos como fuente de aminoácidos esenciales (Wijayanti et al., 2014), como ingrediente en piensos o como ingrediente activo o nutricional (Morr y Ha, 1993). Por lo que la recuperación de las proteínas del suero de leche es una opción atractiva para valorizar este producto.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente documento se evaluó el potencial técnico del suero de leche como materia prima para la producción de bioetanol y biogás.

Materiales y Métodos

Materia prima

Los sueros de leche ácido y dulce se obtuvieron del procesamiento de quesos de la planta piloto del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 86 (CBTA No. 86) El suero dulce fue obtenido de la coagulación de caseína vía enzimática (renina) y el suero ácido por la mezcla de renina y cultivos lácticos. Para todos los experimentos se utilizaron dos lotes de suero de aproximadamente 50 L cada uno, los cuales se mantuvieron en congelación (-10°C) hasta su uso.

Material biológico

Se utilizó una cepa etanolgénica de *Saccharomyces cerevisiae* ITPE01, aislada de caña de azúcar. Así como *Kluyveromyces marxianus* 837, *Kluyveromyces marxianus* 946, la cual se obtuvo de la colección microbiana nacional del CINVESTAV (Instituto Politécnico Nacional). Las cepas fueron conservadas en medio agar papa-dextrosa a 4°C.

Obtención de suero desproteinizado

Para la obtención del suero desproteinizados se siguió la estrategia descrita en la Figura 1. La misma se describe a detalle en un trabajo previo de Jesús-Andrade y colaboradores en 2016.

Caracterización físico-química del suero y fracciones proteicas.

La composición química del suero ácido y dulce fue determinada según la metodología descrita en de Jesús-Andrade y colaboradores (2016). Los componentes evaluados fueron materia seca (A.O.A.C., 2005), cuantificación de proteína (Lowry, et al., 1951); grasa butírica (NMX-F-155-SCFI-2003), pH (NMX-F-317-S-1978), demanda química de oxígeno (DQO HACH® 800), lactosa (Lactoscan), contenido de azúcares reductores (Miller, 1959).

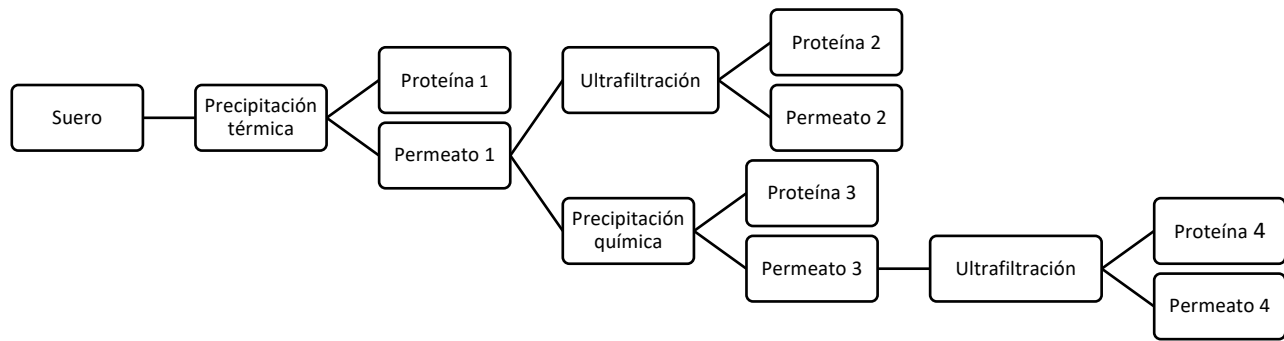


Figura 1. Diagrama general del proceso de desproteínización del suero de leche.

Fermentación alcohólica en dos etapas (hidrólisis-fermentación)

Se realizaron experimentos de hidrólisis química y enzimática con la finalidad de determinar el mejor tratamiento para obtener azúcares fermentables. Las condiciones de hidrólisis se obtuvieron a partir de los resultados publicados por de Jesús-Andrade y colaboradores (2016), en una publicación previa. Para la hidrólisis enzimática se usó la enzima β -galactosidasa (Lactosec®, ENMEX). Como variable de respuesta se consideró la concentración obtenida de glucosa medida con un kit de glucosa oxidasa peroxidasa (Glucosa-TR Trinder GOD-POD, SPINREACT).

Fermentación alcohólica en dos etapas (hidrolisis y fermentación)

1. Metodología de hidrolisis química

El suero de queso fue sometido a un pre-tratamiento de hidrólisis química, para la obtención de las condiciones óptimas de hidrólisis química se tomó de referencia los resultados previos publicados por de Jesús-Andrade y colaboradores (2016). Como variable de respuesta se cuantificó la concentración de glucosa con un kit de glucosa oxidasa peroxidasa.

2. Metodología de la fermentación

Una vez hidrolizadas las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm y 4°C, por 10 minutos, el sobrenadante se filtró en papel filtro Whatman No. 1, se ajustó su pH a 4.5 con NaOH y/o H₂SO₄ a 1 M y se cuantificó su concentración de azúcares reductores mediante el método de DNS (Miller, 1959). Para la fermentación se usaron matraces Erlenmeyer de 1 L en los que se colocaron 500 mL de suero hidrolizado suplementados con fosfato de amonio al 0.3% (v/v). Se agregó un inóculo de 1x10⁷ cel/mL de *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación se realizó en condiciones anaerobias a temperatura de 28°C, y se monitoreó el contenido de azúcares reductores durante 140 horas. Al final de la fermentación las muestras se destilaron, se estimó el porcentaje de etanol y se comparó con el rendimiento teórico.

Fermentación alcohólica de una etapa (hidrólisis-fermentación simultánea)

Para la evaluación de la fermentación alcohólica en una etapa se utilizó como sustrato lactosuero entero y desproteínizado y las cepas *K. marxianus* 837 y *K. marxianus* 946. La fermentación se realizó en lote en matraces de 1 L que contenían 500 mL de muestra, todos los tratamientos se incubaron en condiciones anaerobias a 28°C, durante 72 horas. Durante la cinética se monitoreó el consumo de azúcares reductores por DNS. Al final de la fermentación las muestras se destilaron, se estimó el porcentaje de etanol y se comparó con el rendimiento teórico.

Resultados y Discusión

Composición química del suero de leche y resultados de la desproteínización por diferentes métodos.

A partir de los resultados obtenidos en el trabajo previo de de Jesús-Andrade y colaboradores (2016), se observa que en relación al proceso de desproteínización en la primera etapa del proyecto se intentó separar directamente por ultrafiltración con membranas, sin embargo, debido al alto contenido de sólidos en las muestras, se obtenían muy bajos

porcentajes de permeato en relación al retentado, lo que dificultaba la separación de las proteínas. Es por esta razón, que se evaluaron tres diferentes procesos de separación de sólidos dentro de los cuales se incluyó la ultrafiltración. Los resultados en cuanto rendimiento de sólidos recuperados y el porcentaje de proteína que contenían esos sólidos se presentan en la Tabla 1. El análisis de varianza de los resultados ($\alpha = 0.05$) y la comparación de medias (Tukey) mostraron que existe diferencia significativa entre los tratamientos. La mayor cantidad de sólidos recuperados se encontró en el tratamiento térmico, pero el contenido proteico de estas muestras (32.84%) fue inferior al de los sólidos recuperados por tratamiento combinado térmico-ultrafiltración (77.00%).

Tabla 1. Resultados de la extracción de proteína de suero de leche mediante el uso de tres métodos de extracción

Tratamiento	Rendimiento de sólidos (g/L)	Contenido de proteína (mg/g de sólidos)
Término (P1)	32.50 ± 5.60	32.84 ± 9.55
Térmico-Ultrafiltración (P2)	9.13 ± 0.82	77.00 ± 5.38
Térmico-Químico (P3)	13.8 ± 0.05	4.19 ± 1.65

Con base a los resultados obtenidos se estimó la cantidad máxima de proteína recuperada multiplicando el rendimiento de sólidos de tratamiento térmico (32.5 g de sólidos/L de suero) por el contenido de proteína del mismo tratamiento (32.84 mg/g de sólidos) y se obtuvo un valor de 1.067 mg de proteína/L de suero, este valor representa aproximadamente el 56% del contenido total de proteína del suero, lo que indica que aún es factible realizar mejoras al proceso.

El principal sustrato que utilizan los microorganismos en las fermentaciones (en este caso en la fermentación alcohólica) son los azúcares, por ello, es importante determinar cómo afecta el proceso de desproteínización la concentración de este componente. Los resultados mostraron que las concentraciones más altas se obtienen cuando se usa tratamiento térmico y se recupera mayor cantidad de azúcares en el suero dulce desproteínizado (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de azúcares reductores de los sueros desproteínizados por diferentes métodos

Tratamiento	Concentración de azúcares reductores (g/L)	
	Suero dulce	Suero ácido
Término (P1)	48.78 ± 0.79	38.44 ± 1.71
Térmico-Ultrafiltración (P2)	29.59 ± 1.28	30.97 ± 0.55
Térmico-Químico (P3)	22.20 ± 0.37	25.83 ± 0.98

Fermentación alcohólica en dos etapas (hidrólisis-fermentación).

1. Optimización de la hidrólisis de lactosa

Durante el proceso de optimización se obtuvo un modelo de superficie de respuesta (Ecuación 1; Box-Benken, $P=0.016$). Mediante este modelo se obtuvieron las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática con β -galactosidasa cuyos valores fueron: 15 minutos, 0.45 mL de enzima y 35°C (Figura 3).

$$\text{azúcares reductores} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 124.6 - 5.34t - 4.7E - 2.31T + 0.0421t^2 - 2.84E^2 + 0.0072T^2 + 0.436t \cdot E + 0.0805t \cdot T - 0.018E \cdot T \quad (1)$$

Donde:

T=temperatura

t=Tiempo

E=Concentración de enzima

Para verificar los resultados estimados en el modelo (24.38 mg de glucosa/mL) se debe realizar el ensayo con las condiciones óptimas.

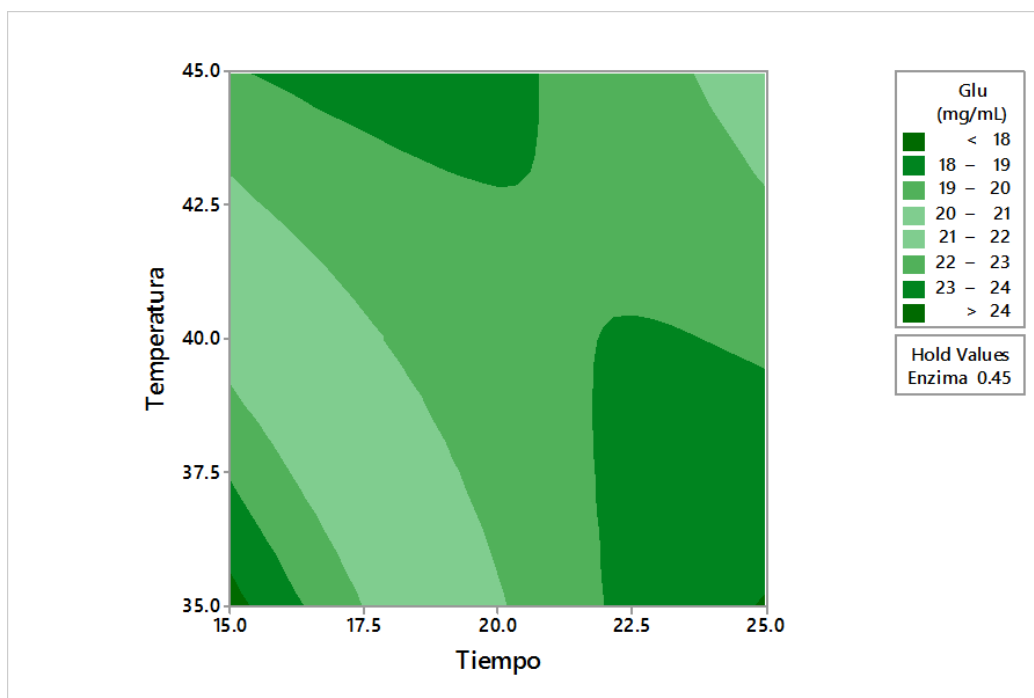


Figura 3. Gráfico que muestra los rendimientos de glucosa obtenidos durante la hidrólisis enzimática de lactosuero

En la hidrólisis química el análisis estadístico mostró diferencia significativa ($P=0.000$; Tabla 3; Figura 4) entre los tratamientos y las interacciones ($P=0.000$; Tabla 3; Figura 4). Los rendimientos son mejores a medida que se incrementa el tiempo de incubación de 30 a 90 min. En relación a la temperatura, en general se observó una relación inversa, es decir, al incrementar la temperatura se reduce la concentración de glucosa obtenida. La eficiencia de hidrólisis es baja cuando se utilizan bajas concentraciones de ácido (0.01, 0.1 mol/L) y se incrementa notablemente cuando se usan concentraciones de 1 mol/L. Los mejores resultados se obtienen cuando las condiciones del proceso son 90 minutos, 100°C y 1 mol de ácido/L.

Tabla 3. Resultados de rendimiento de glucosa obtenidos en la hidrólisis química (ácida) de lactosuero

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración de ácido clorhídrico (m/L)	Concentración final de glucosa (mg/mL)
30	121	0.01	0.518 ± 0.004
		0.10	0.803 ± 0.010
		1.00	12.305 ± 0.338
	100	0.01	0.863 ± 0.002
		0.10	0.995 ± 0.011
		1.00	1.540 ± 0.056
90	121	0.01	0.968 ± 0.005
		0.10	0.780 ± 0.004
		1.00	19.996 ± 0.221
	100	0.01	0.770 ± 0.008
		0.10	1.013 ± 0.007
		1.00	24.058 ± 0.942

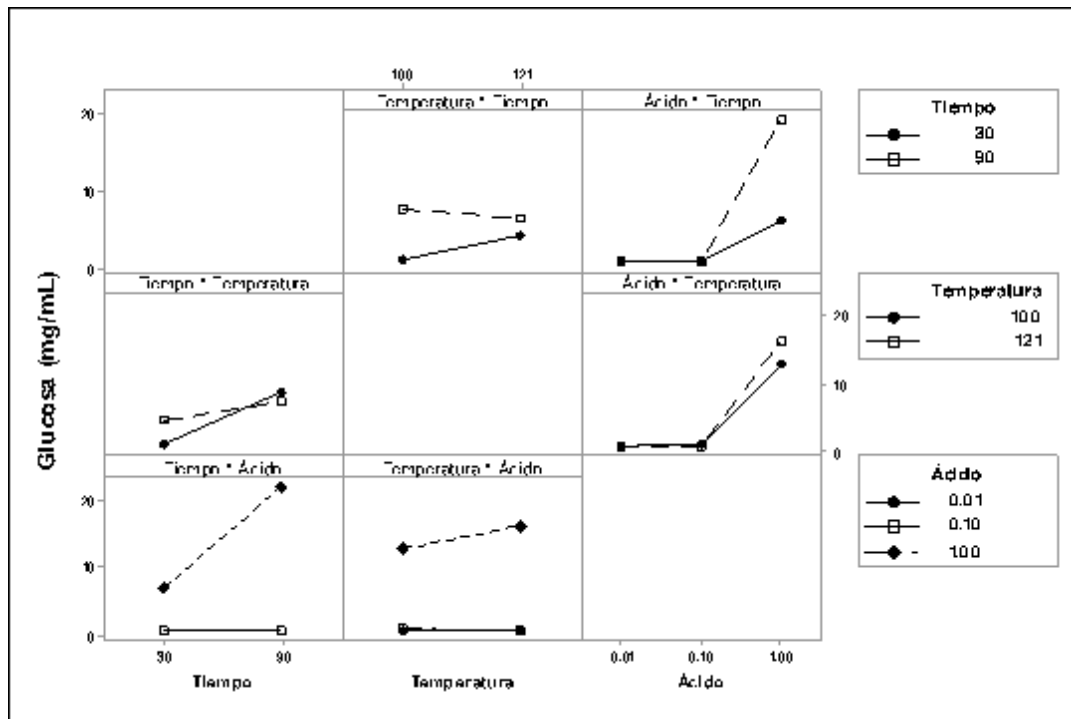


Figura 4. Evaluación estadística de los efectos de los diferentes tratamientos de hidrólisis química (ácida) de lactosuero

2. Fermentación de alcohol en dos etapas.

El consumo de azúcar de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada sobre suero dulce mostró una tendencia polinomial de segundo orden, en los tres casos, se observaron dos fases: una de consumo acelerado y otra de consumo lento (Figura 5A, 5B y 5C). En suero entero se observó una velocidad máxima de consumo durante las primeras 48 h (0.659 g de azúcar/h), y una reducción en la velocidad de consumo de las 48 a las 120 h (0.1866 g de azúcar/h), mientras que, en el suero desproteínizado por tratamiento térmico la velocidad máxima de consumo de azúcar se detectó antes de las 96 h (0.24 g de azúcar/h) y se redujo después de este periodo (0.026 g de azúcar/h). En el suero dulce desproteínizado por tratamiento térmico, la máxima velocidad de consumo de azúcar también se presentó antes de las 96 h (0.31 g de azúcar/h) y posteriormente se redujo (0.16 g de azúcar/h). La reducción en la velocidad de consumo de azúcar en los tres tratamientos, puede deberse al agotamiento de algún otro nutriente diferente a los azúcares que esté actuando como sustrato limitante tal como nitrógeno (Stambury *et al.*, 2013). Sin embargo, en este trabajo dicho componente no fue determinado durante la cinética.

En el suero ácido la velocidad de consumo de azúcares se mantuvo constante durante toda la cinética por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5D, 5E, y 5F). La velocidad máxima de consumo fue muy similar en los tres sustratos (0.16, 0.16 y 0.15 g de azúcar/h, para suero entero, suero desproteínizado por tratamiento térmico y suero desproteínizado por tratamiento químico).

En relación a la producción de etanol en general por cada litro de lactosuero se obtuvieron valores de 12-19 mL. El rendimiento de etanol con relación al sustrato fue mejor en suero desproteínizado por tratamiento térmico (0.759 g de etanol/g de glucosa). Por otro lado, la eficiencia en el consumo de azúcar en este tratamiento indica que es posible incrementar los rendimientos hasta casi el doble si se logra aumentar el consumo de azúcar durante la fermentación (Tabla 4).

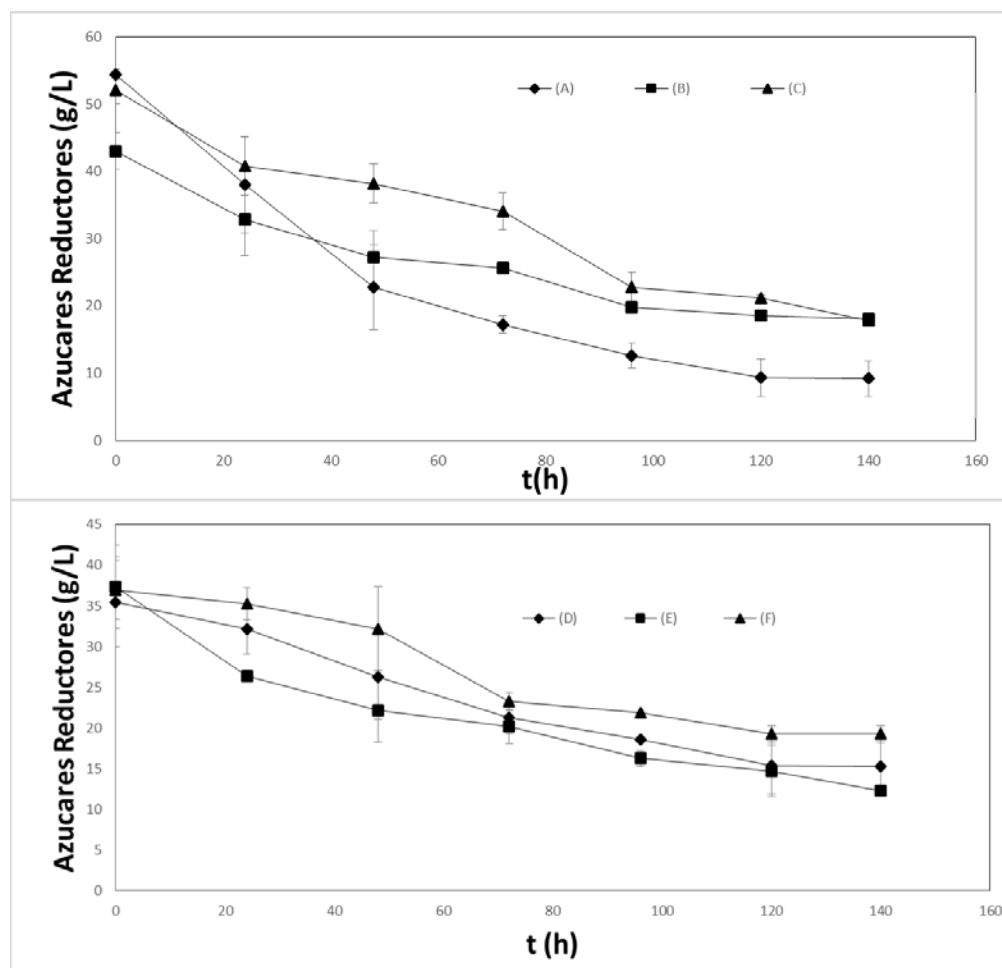


Figura 5. Gráfico que muestra el consumo de azúcares durante la fermentación del suero de leche pre-tratado por dos diferentes métodos de desproteización: (A) Suero dulce, (B) Suero dulce con tratamiento térmico, (C) Suero dulce con precipitación química, (D) Suero ácido, (E) Suero ácido con tratamiento térmico, (F) Suero ácido con tratamiento químico.

Tabla 4. Producción de etanol mediante hidrólisis enzimática con β -galactosidasa y *Saccharomyces cerevisiae* (dos etapas) usando como sustrato lactosuero.

Tipo de suero	Tratamiento	Producción de etanol (g/L de suero)	$Y_{P/S}$ (g de etanol / g de glucosa)	Eficiencia de consumo de azúcar (%)
Dulce	Entero	15.80 \pm 0.00	0.334	83.09
	Desproteizado térmico	18.96 \pm 0.00	0.759	57.93
	Desproteizado químico	15.80 \pm 0.00	0.759	57.93
Ácido	Entero	12.64 \pm 0.00	0.625	57.03
	Desproteizado térmico	15.80 \pm 0.00	0.631	67.08
	Desproteizado químico	15.80 \pm 0.13	0.894	47.89

Fermentación alcohólica en una etapa

Para hidrólisis-fermentación simultánea del lactosuero se probaron dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* Km 837 y Km 946. En general, la cepa Km 837 se adaptó mejor al lactosuero principalmente en suero dulce, lo cual se refleja en el consumo de azúcar durante la fermentación (Figura 6). Los resultados fueron mejores cuando se empleó suero entero ácido con la cepa Km 837 (velocidad de consumo 0.509 g de glucosa/h), seguido de suero con pretratamiento de desproteización térmica (0.426 g de glucosa/h; Figura 6 y Tabla 5). Los mismos tratamientos resultaron ser los mejores en la obtención de etanol, la producción máxima obtenida fue de 25.28 y 25.12 g de etanol/g de lactosuero en

suero ácido entero y en suero ácido tratado térmicamente respectivamente, ambos valores se obtuvieron cuando se usó la cepa Km 837.

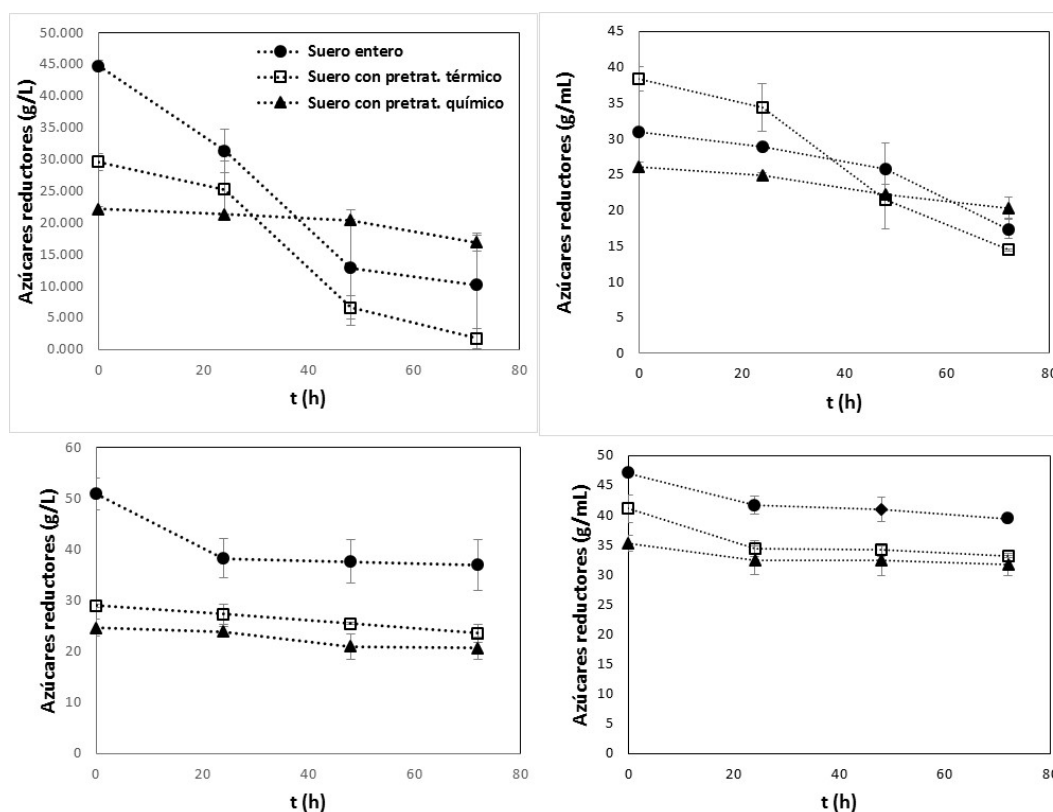


Figura 6. Consumo de azúcares durante la fermentación en una etapa usando dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* cultivado en suero de leche. (A) Suero ácido Km 837, (B) Suero dulce Km 837, (C) Suero ácido Km 946, (D) Suero dulce Km 946.

Tabla 5. Parámetros de producción de etanol y consumo de azúcar por fermentación con *Kluyveromyces marxianus* (una etapa) usando como sustrato lactosuero.

Tipo de suero	Cepa de microorganismo	Pre-tratamiento	Velocidad de consumo de azúcar (g de glucosa / h)	Eficiencia en el consumo de azúcar (%)	Producción de etanol (g/L de suero)	$Y_{P/S}$ (g de etanol / g de glucosa)	
Dulce	Km 837	Entero	0.183	43.92	15.80 ± 0.00	1.38	
		Térmico	0.353	62.34	18.96 ± 0.00	0.79	
		Químico	0.084	22.13	18.96 ± 0.00	0.759	
	Km 946	Entero	0.099	16.31	0.00 ± 0.00	-	
		Térmico	0.105	19.53	0.00 ± 0.00	-	
		Químico	0.045	10.14	0.00 ± 0.00	-	
	Ácido	Km 837	Entero	0.509	77.22	22.12 ± 0.00	0.64
			Térmico	0.426	94.12	25.28 ± 0.00	0.91
			Químico	0.071	23.91	0.00 ± 0.00	-
Km 946		Entero	0.177	27.37	0.00 ± 0.00	-	
		Térmico	0.076	18.86	0.00 ± 0.00	-	
		Químico	0.062	16.25	0.00 ± 0.00	-	

En la Tabla 6 se presentan los mejores resultados obtenidos en los dos procesos evaluados (proceso de una y de dos etapas). Con base a los mismos, se determinó que para la producción de bioetanol en suero ácido es mejor utilizar el proceso de una etapa (con *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo) y para el suero dulce el proceso más apropiado es el de dos etapas (hidrólisis enzimática-fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*). En ambos casos se recomienda desproteínizar el suero antes de la fermentación por tratamiento térmico debido a que se obtendrá un co-producto adicional (proteína alimentaria) y se incrementarán los rendimientos de etanol.

Tabla 6. Parámetros de producción de etanol y consumo de azúcar por fermentación con *Kluyveromyces marxianus* (una etapa) usando como sustrato lactosuero.

Tipo de proceso	Pretratamiento de desproteínización	Proceso usado	Tipo de sustrato	Producción de etanol (g / L de suero)
Una etapa	Sin tratamiento	Fermentación con <i>K. marxianus</i> Km 837	Suero ácido	22.12
	Térmico			25.28
Dos etapas	Térmico	Hidrólisis enzimática, fermentación con <i>S. cerevisiae</i>	Suero dulce	18.96

Conclusiones

Se implementaron y evaluaron las operaciones de tratamiento térmico, precipitación química y ultrafiltración para la obtención de diferentes fracciones proteicas del suero de leche y se determinó que la cantidad de sólidos en el suero de queso afecta la producción de etanol, pues se obtuvieron incrementos en la tasa de producción de etanol en aquellos a los cuales se les aplicó un tratamiento térmico o químico. Durante la evaluación de la fermentación de los permeatos obtenidos por diferentes tratamientos de desproteínización se confirmó que el mejor método es el que utiliza tratamiento térmico. Por otra parte, los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento térmico del suero, debido a que bajo estas condiciones se recupera la mayor cantidad de proteína, sin afectar la cantidad de azúcar residual en el suero de leche, lo que permite que este pueda usarse en la fermentación. Para las fermentaciones con *Kluyveromyces marxianus*, se encontró que la cepa Km 837 tuvo una mejor adaptación al suero de queso, principalmente en sueros dulces y con desproteínización térmica, en las cuales se obtuvieron producciones de etanol de 25.28 g de etanol por cada litro de suero de leche. Para sueros ácidos, se encontró que la mayor cantidad de etanol se obtuvo con la fermentación en dos etapas y utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, previamente tratados térmicamente, obteniendo hasta 18.96 g de etanol por cada litro de suero de leche. El proceso de una etapa tiene la ventaja de que es más sencillo en la operación.

Bibliografía

- Alvarez-Delgado, A., Otero-Rambla, M. A. 2020. 1 Potencialidad del suero de leche en biotecnología (Potential of cheese whey in biotechnology) Amaury Álvarez. Revista Biorrefinería Vol, 3(3).
- Amado, I.R., Vázquez, J.A., Pastrana, L., Teixeira, J.A., 2016. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Food Chemistry 198, 54–61. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.062
- Anand, S., Nath, S. K., Marella, C., 2013. Whey and whey products. In: Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health, First Edition. Edited by Young W. Park and George F.W. Haenlein.
- A.O.A.C, 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analyst Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Boudjema K., Fazouane-Naimi F., Hellal A. 2015. Optimization of the bioethanol production on sweet cheese whey by *Saccharomyces cerevisiae* DIV13-Z087C0VS using response surface methodology (RSM). Romanian Biotechnological Letters 20:10814–10825.
- Carrillo, H., 2003. Microbiología Agrícola, Argentina, Unas. 1-5 p.
- Boura, K., Kandyli, P., Bekatorou, A., Kolliopoulos, D., Vasileiou, D., Panas, P., Kanellaki, M., Koutinas, A. A. (2017). New generation biofuel from whey: successive acidogenesis and alcoholic fermentation using immobilized cultures on γ -alumina. Energy Conversion and Management, 135, 256-260.
- Collazos, C.C.J. y Diaz, B.M.C., 2003. Ensayos de biodegradabilidad anaerobia de efluentes cerveceros con lodo granular y lodo floculento. Revista Ingeniería e Investigación, 52, 54-62
- Das, B., Roy, A.P., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S., Bhattacharjee, C., 2015. Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. Ecotoxicology and Environmental Safety 121, 244–252. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.024
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A., 2009. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. Food Chemistry 112, 929–935. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.005

- De Jesús-Andrade, E., Osorio-González, C., Sandoval-Salas, F., Ávalos-De La Cruz, D. 2016. Producción de bioetanol a partir de suero de queso proveniente de la región central del estado de Veracruz. *Revista de Sistemas Experimentales*, 3-9: 42-50. doi:
- Gomez, G. A., Nagel, O. G., Althaus, R. L., Ceruti, R. J. 2019. Crecimiento y Características Fermentativas de *Kluyveromyces marxianus* en Matrices Derivadas de Lactosuero. VII Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión.
- Hadiyanto, Ariyanti, D., Aini, A.P., Pinundi, D.S., 2014. Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-batch Fermentation Using *Kluyveromyces Marxianus*. *Energy Procedia* 47, 108–112. doi:10.1016/j.egypro.2014.01.203
- Hublin, A., Zokić, T.I., Zelić, B., 2012. Optimization of biogas production from co-digestion of whey and cow manure. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17, 1284–1293. doi:10.1007/s12257-012-0044-z
- Kádár, Z., Christensen, A.D., Thomsen, M.H., Bjerre, A.-B., 2011. Bioethanol production by inherent enzymes from rye and wheat with addition of organic farming cheese whey. *Fuel* 90, 3323–3329. doi:10.1016/j.fuel.2011.05.023
- Koutinas, A.A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A., Bosnea, L.A., 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology* 100, 3734–3739. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.058
- Krissansen, G.W., 2013. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. *Journal of the American College of Nutrition* 26, 713S–723S. doi:10.1080/07315724.2007.10719652
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3), 426-428.
- Moreno, R., Fierro, J., Fernández, C., Cuetos, M.J., Gómez, X., 2015. Biohydrogen production from lactose: influence of substrate and nitrogen concentration. *Environmental Technology* 36, 2401–2409. doi:10.1080/09593330.2015.1032365
- Morr, C.V., Ha, E.Y.W., 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33 (6) 431-476
- Mukhopadhyay, R., Talukdar, D., Chatterjee, B.P., Guha, A.K., 2003. Whey processing with chitosan and isolation of lactose. *Process Biochemistry* 39, 381–385. doi:10.1016/S0032-9592(03)00126-2
- Navas, J.S.R., 2015. Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. *Publicaciones e Investigación* 6, 69–83.
- Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003, Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-317-S-1978, Determinación de pH en alimentos.
- Pacheco, José, Magaña, Aldo, Arranque de un reactor anaerobiológico [en línea] 2003, 7 (enero-abril): Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46770102>> ISSN 1665-529X
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105, 1–14. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.035
- Pintado, M.E., Macedo, A.C., Malcata, F.X., 2001. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food. Sci. Tech. Int.* 7 (2) 105-116
- Park, S.J., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88–113.
- Ramos, L. R., Silva, E. L. (2017). Continuous hydrogen production from agricultural wastewaters at thermophilic and hyperthermophilic temperatures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(2), 846-869.
- Remón, J., Laseca, M., García, L., Arauzo, J., 2016. Hydrogen production from cheese whey by catalytic steam reforming: Preliminary study using lactose as a model compound. *Energy Conversion and Management* 114, 122–141. doi:10.1016/j.enconman.2016.02.009
- Sarris, D., Papanikolaou, S., 2016. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences* 16, 307–329. doi:10.1002/elsc.201400199
- Smithers, G.W., 2015. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal* 48, 2–14. doi:10.1016/j.idairyj.2015.01.011
- Soriano-Perez, S., Flores-Velez, L., Alonso-Davila, P., Cervantes-Cruz, G., Arriaga, S., 2012. Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Annals of Microbiology* 62, 313–317. doi:10.1007/s13213-011-0264-z
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 2013. *Principles of Fermentation Technology*. 4ta Ed. Elsevier Science Ltd. Great Britain.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater., 1998. American Public Health Association.
- Tavares, T., Malcata, F.X., 2016. Whey and Whey Powders: Fermentation of Whey, in: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 486–492.
- Valentino, F., Riccardi, C., Campanari, S., Pomata, D., Majone, M., 2015. Fate of β -hexachlorocyclohexane in the mixed microbial cultures (MMCs) three-stage polyhydroxyalkanoates (PHA) production process from cheese whey. *Bioresource Technology* 192, 304–311. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.083
- Wijayanti, H.B., Bansal, N., Deeth, H.C., 2014. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review: Thermal stability of whey proteins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 1235–1251. doi:10.1111/1541-4337.12105
- Yadav J.S.S., Yan S., Pilli S. 2015. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 33:756–774. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.002
- Zhong, J., Stevens, D.K., Hansen, C.L., 2015. Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). *International Journal of Hydrogen Energy* 40, 15470–15476. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.09.085