

---

# *Reducción óptima de la carga orgánica del lactosuero dulce mediante el crecimiento de Kluyveromyces Marxianus (KM)*

E. Gutierrez<sup>\*</sup> y M. Bastidas<sup>1</sup>

<sup>\*</sup>Facultad de Ingenierías y Tecnológicas, Universidad Popular del Cesar, Salida a Patillal, Valledupar, Colombia.

<sup>1</sup>Facultad de Ingenierías, Universidad de La Guajira, km 5, vía a Maicao, Riohacha, Colombia

---

*Optimum organic charge reduction of sweet whey by growth Kluyveromyces marxianus (KM)*

*Reducció òptima de la càrrega orgànica del lactosèrum dolç mitjançant el creixement de Kluyveromyces marxianus (KM)*

*Recibido: 14 de noviembre de 2014; revisado: 19 de julio de 2015; aceptado: 28 de octubre de 2015*

## RESUMEN

La producción de queso es uno de los procesos más contaminantes de la industria láctea, se estima que el 50% del lactosuero que se genera es desechado directamente sobre los recursos hídricos, arriesgando la supervivencia de muchas especies de flora y fauna, por la reducción del oxígeno disuelto, que es afectado por la carga orgánica del mismo. Esto puede relacionarse a la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la cual puede llegar a cerca de 80000 mg/L. La finalidad de esta investigación fue reducir eficientemente la carga orgánica del lactosuero, mediante la optimización de su uso como sustrato para el crecimiento de Kluyveromyces Marxianus (KM). El desarrollo de este trabajo permitió establecer las mejores condiciones para el crecimiento de la levadura sumergida en lactosuero, mediante el Análisis de Varianza de un diseño factorial 2<sup>3</sup> y aplicación del Análisis de Superficie de Respuesta para el modelo reducido, logrando alcanzar una tasa de crecimiento promedio de 0,379 y una tasa máxima de 0,714 h<sup>-1</sup>, removiendo 64,3 % de la DQO, mediante fermentación aeróbica de 10 a 12 horas, y de 79,6 %, al incluir el pretratamiento realizado.

**Palabras clave:** Lactosuero; Kluyveromyces marxianus; DQO; tasa de crecimiento.

## SUMMARY

Cheese production is one of the most polluting processes in the dairy industry, it's estimated that 50% of the whey that is generated is discarded directly on water resources, risking the survival of many species of flora and fauna, by the reduction of dissolved oxygen, which is affected by the organic load of the same. This may relate to the Chemical Oxygen Demand (COD), which can reach about 80000 mg/L. The purpose of this research was to reduce efficiently the organic load of whey by optimizing its use as a substrate for the growth of Kluyveromyces marxianus (KM). The development of this project allowed to es-

tablish the best conditions for growth of the submerged yeast in whey, using Analysis of Variance for 2<sup>3</sup> factorial design and implementation of Response Surface Analysis for the reduced model, achieving an average growth rate of 0,379 and a maximum rate of 0,714 h<sup>-1</sup>, removing 64,3 % of COD, by aerobic fermentation over a period of 10 to 12 hours, and 79,6 %, to include pretreatment performed.

**Keywords:** Whey; Kluyveromyces marxianus; COD; growth rate.

## RESUM

La producció de formatge és un dels processos més contaminants de la indústria làctia, s'estima que el 50% de lactosèrum que es genera és rebutjat directament sobre els recursos hídrics, arriscant la supervivència de moltes espècies de flora i fauna, per la reducció de l'oxigen dissolt, que és afectat per la càrrega orgànica. Això pot relacionar-se amb la Demanda Química d'Oxigen (DQO), la qual pot arribar a prop de 80000 mg/L. La finalitat d'aquesta investigació va ser reduir eficientment la càrrega orgànica del lactosèrum, mitjançant l'optimització del seu ús com a substrat per al creixement de Kluyveromyces Marxianus (KM). El desenvolupament d'aquest treball va permetre establir les millors condicions per al creixement del llevat submergit en lactosèrum, mitjançant l'Anàlisi de Variància d'un disseny factorial 2<sup>3</sup> i aplicació de l'Anàlisi de Superfície de Resposta per al model reduït, aconseguint assolir una taxa de creixement mitjana de 0,379 i una taxa màxima de 0,714 h<sup>-1</sup>, remenant 64,3% de la DQO, mitjançant una fermentació aeròbica de 10 a 12 hores, i de 79,6%, quan es va incloure el pretractament realitzat.

**Paraules clau:** Lactosèrum; Kluyveromyces marxianus; DQO; taxa de creixement.

<sup>\*</sup>Autor para la correspondencia: einergutierrez@unicesar.edu.co

## INTRODUCCION

El lactosuero es el líquido que se separa del queso, luego de la precipitación de la caseína y que corresponde a nueve veces la masa de queso producido [1]. El lactosuero conserva aún el 55% de los nutrientes de la leche, siendo el más abundante la lactosa, la cual aporta del 80 a 90% de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) que ostenta este abundante líquido, cuyos valores oscilan entre 60000 y 80000 mil mg/L [1]. Se han identificado dos tipos de lactosuero, el dulce, que proviene de la coagulación con enzimas proteolíticas, y se obtiene a pH cercano a 6,5; y el suero ácido que proviene de coagulaciones realizadas por acidificaciones logradas mediante fermentación o adición de ácidos orgánicos o minerales hasta pH menor que 5,0, en la fabricación de quesos frescos o caseínas industriales. Las principales diferencias entre el lactosuero dulce y el ácido, son el contenido de minerales, la acidez y la composición de la fracción proteica [2]. El lactosuero constituye una importante fuente de contaminación ambiental, debido al alto contenido de materia orgánica el cual además del elevado valor de DQO, tiene un  $DBO_5$  entre 30.000 y 50.000 mg/L, de los cuales cerca del 90% es aportada por el contenido de lactosa, con la desventaja que posee un tipo de enlace entre sus azúcares que hace que muchos microorganismos no sean capaces de degradarlo [3].

En este sentido, se han realizado muchos esfuerzos en la búsqueda de alternativas viables que permitan aprovechar el lactosuero dándole una valorización como subproducto. Entre estas alternativas se ha ensayado: obtención de alcohol mediante fermentación [4-6], bebidas [7], ácidos orgánicos y plásticos biodegradables [8], levaduras para usos en panadería [9], extracción enzimática [10] y biocombustibles [11], entre otros. A pesar de la diversidad de aplicaciones para el lactosuero, el consumo energético en mucho de los casos limita algunas de estas alternativas, solamente para grandes volúmenes de producción, ya que los costos de operación se elevan demasiado [3, 12].

En este trabajo se desarrolla una metodología para aprovechar los nutrientes del lactosuero mediante el uso de levaduras del género *Kluyveromyces*, las cuales se caracterizan por la capacidad de aprovechar la lactosa como fuente de carbono para su reproducción, ya que producen en su interior la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cuya función es la de desdoblar la lactosa en sus dos azúcares componentes. Además el perfil de aminoácidos de la proteína proveniente de *Kluyveromyces Marxianus* (KM) presenta una distribución equilibrada al compararla con patrones de referencia internacionales de la FAO y con las proteínas del huevo y el trigo, lo que sugiere su uso como fuente proteica [13]. Es importante mencionar que desde el punto de vista de la Microbiología KM es una especie de levadura perteneciente a los Ascomycetos, con capacidad de formar esporas y por tanto es un hongo con predominio de la fase unicelular en su ciclo de vida que se caracteriza por su reproducción asexual por gemación en medios nutricionalmente ricos, pudiendo llegar a producir hasta 43 yemas durante su vida activa [14].

La estimación de la producción diaria de lactosuero en Colombia es de 2,5 millones de litros y de esta cantidad cerca del 50% es desechado en cuerpos de agua sin ningún tratamiento previo, afectando directamente la disponibilidad de oxígeno disuelto necesario para la

supervivencia de la flora y la fauna, cuyo límite mínimo para este propósito en aguas cálidas es de 4,0 mg/L [15]. Dado el alto impacto contaminante del lactosuero sobre los recursos hídricos colombianos, cuya carga mínima estimada de lactosuero equivale al consumo de 43,5 toneladas de oxígeno disuelto, la búsqueda y optimización de metodologías que contribuyan a la reducción de esta fuente de contaminación, es sin duda, no sólo pertinente, sino de innegable importancia para la preservación del medio ambiente. El objetivo de este proyecto fue la reducción eficiente de la carga orgánica del lactosuero dulce generado en la industria quesera, optimizando su uso como sustrato para el crecimiento de KM (ATCC 36142), con lo cual se contribuyó al conocimiento en cuanto a la manera adecuada para reducir la carga orgánica contaminante del lactosuero, aprovechando las características del microorganismo KM, que logró mejorar la eficiencia del proceso de bioconversión, de este desecho contaminante de la industria quesera, en biomasa con varias potenciales aplicaciones biotecnológicas [16]; mejora que quedó evidenciada por los elevados valores de las tasas de crecimiento y por la reducción del tiempo de proceso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

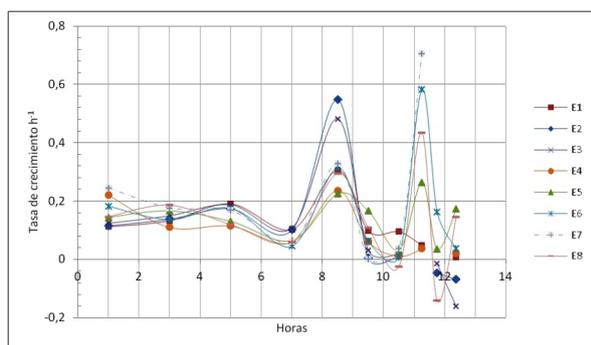
Se realizaron ensayos a escala de laboratorio, con el fin de comprobar los factores más influyentes en el proceso de reducción de la carga contaminante del lactosuero, mediante el crecimiento de biomasa de la levadura KM en lactosuero dulce de quesería, comprobando los niveles de dichos factores que lograban mejorar el proceso. La cepa de levadura utilizada fue adquirida en estado liofilizado del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) de la Universidad Central de Venezuela, con la siguiente identificación: *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* CVCM 2088 equivalente a ATCC 36142. Las muestras de lactosuero dulce, se obtuvieron de algunas empresas lácteas del Cesar y La Guajira, los cuales son estados al norte de Colombia, consideradas como regiones ganaderas. Se recolectaron muestras tomadas aleatoriamente durante el proceso de elaboración de queso. Por cada ensayo se requerían 1400 mL de lactosuero aproximadamente. La muestra se refrigeraba a 4,0 °C para ser trasladada a las instalaciones de los laboratorios del Centro de Investigación para el Desarrollo de la Ingeniería (CIDI) de la Universidad Popular del Cesar, donde se realizó la adecuación del mismo, consistente en coagulación térmica (a pH 6,5 y 95°C por 15 min), filtración (papel filtro franja azul), ajuste de pH a 4,4 y refrigeración a 4°C.

Para el desarrollo experimental, se exploraron los efectos de tres factores y sus interacciones sobre el proceso de crecimiento de la levadura y la remoción de carga orgánica del lactosuero, utilizando un diseño factorial  $2^3$  con dos réplicas, cuyo Análisis de Varianza permitió obtener los modelos reducidos, al tomar en cuenta sólo los factores o las interacciones que presentaron los efectos más significativos en los cambios presentados en las variables de respuesta [17]. Los ensayos de crecimiento se realizaron hasta la finalización de la fase estacionaria, teniendo como variables independientes el Inóculo (mg levadura/mL), la Suplementación (% sulfato de amonio) y la Cosecha (Cantidad) y como variables de respuesta la Tasa de crecimiento en fase exponencial ( $h^{-1}$ ) y la Remoción de Carga orgánica expresada como porcentaje de DQO. Los

factores fijos fueron: Aireación (1,5 litros/minuto), Velocidad de agitación (200rpm), Temperatura (25 - 28°C) y pH (4,40 ± 0,03). A partir de los modelos reducidos se realizó el Análisis de Superficie de Respuesta que permitió visualizar los niveles de los factores que mejoran los resultados del proceso. Finalmente, se realizaron pruebas confirmativas por triplicado para todas las fases de crecimiento (19 horas), del mejor tratamiento, comprobando los niveles óptimos para la producción de la levadura y la reducción de la carga orgánica contaminante del lactosuero. Al ejecutar este proyecto se exploraron nuevas opciones específicas para el crecimiento de la levadura en mención, contribuyendo al mejoramiento de las condiciones para la remoción eficiente de la carga orgánica (medida como DQO) del lactosuero, debido a la optimización de la reproducción de la levadura.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las tasas de crecimiento calculadas para cada hora, presentaron un pico máximo durante la hora octava, y luego un descenso que se extiende hasta la décima hora. Sin embargo, en los tratamientos con alto nivel de cosecha (E5 a E8), ocurre un segundo incremento en las tasas de crecimiento durante la hora siguiente (Ver Figura 1), lo que indica una mayor extensión del tiempo de acción sobre el sustrato a elevadas tasas de crecimiento.



**Figura 1.** Comportamiento de las tasas de crecimiento de KM por hora.

El Análisis de Varianza, realizado a las tasas promedio de crecimiento en fase exponencial permitió identificar los efectos significativos entre los factores estudiados y sus interacciones, obteniendo el modelo factorial reducido cuyos términos explican el 95% de los cambios presentados en la tasa de crecimiento (Ver Ecuación 1).

$$y = 0,29 - 0,02 A - 0,04 AB + 0,01 BC \quad (1)$$

Donde\*:

A = Porcentaje de inóculo

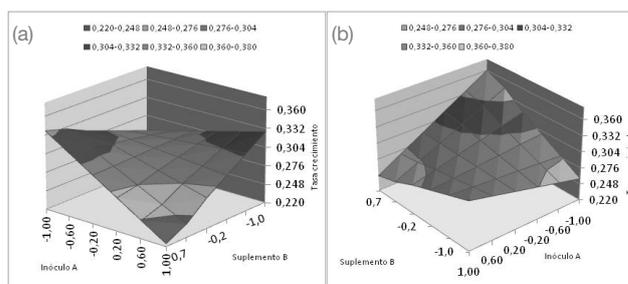
B = Porcentaje de suplementación

C = Cantidad de cosechas

\*Las variables están codificadas: nivel bajo (-1) y nivel alto (1)

Al realizar el Análisis de Superficie de Respuesta elaborado a partir del modelo reducido (Ver Figura 2), se logró visualizar las tendencias en los factores que conducen a maximizar la tasa de crecimiento de la levadura, encontrándose que es preferible utilizar bajo nivel de Inóculo y altos de Suplementación y Cosecha, ya que se aumentaron las tasas de crecimiento (0,376 y 0,382 h<sup>-1</sup>) durante

la fase exponencial. Esto podría estar relacionado con la disminución de la competencia por nutrientes en estas condiciones. Las tasas máximas más sobresalientes fueron 0,714 y 0,680 h<sup>-1</sup> correspondientes a los tratamientos siete y dos, ocurridas entre las 8,5 y 11,5 horas de haberse iniciado los procedimientos. Estos resultados son excelentes, al contrastarlos con los reportados por otros autores: 0,338 [18]; 0,42 [19]; 0,60 [20]; 0,62 [21] y rango medio de 0,15 a 0,40 con máxima de 0,70 h<sup>-1</sup> en medios enriquecidos y a 37°C [16]. Los tiempos de fermentación se ubican en el rango de 20 a 48 horas.



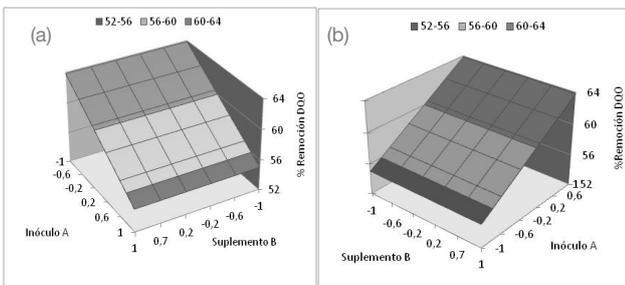
**Figura 2.** Superficie de respuesta para la tasa de crecimiento exponencial (h<sup>-1</sup>) con niveles bajo (a) y alto (b) de cosecha en función de factores Inóculo y Suplemento.

En cuanto a la reducción de la carga orgánica del lactosuero, el Análisis de Varianza para el porcentaje de remoción de la DQO, presentó que ninguno de los factores estudiados tiene efecto significativo directo. Sin embargo, la interacción del Porcentaje de Inóculo con la Cantidad de cosechas, presenta una significancia de 0,02, por lo que se puede afirmar que la combinación de estos dos factores influye en la remoción de DQO, siendo deseables que los niveles de éstos se encuentren cruzados, es decir, para valores altos de Inóculo, se debe utilizar bajo número de cosechas y, viceversa, como se evidencia en el Análisis de Superficie de Respuesta (Véase la Figura 3), elaborado con la interacción significativa (Ver ecuación 2). Para estas condiciones, se observaron remociones promedio entre 61,9 y 66,4% (Ver Figura 4), equivalentes a valores finales de DQO de 11600 y 10200 mg/L; mientras que para las observaciones en las que los niveles de ambos factores eran similares, se presentaron remociones entre 51,4 y 57,2%. Al tomar en cuenta la remoción de DQO implicada por el proceso de coagulación térmica realizado como acondicionamiento previo del lactosuero, se logró remover en total el 79,6% de la DQO contenida en el lactosuero crudo, cuyo valor inicial era de 51500 mg/L. Este resultado es excelente para los productores, tomando en cuenta que en Colombia se exige la remoción del 80% de la carga orgánica para cumplir con las normas de vertimiento en un sistema de tratamiento [15], aunque las normas proyectadas para industrias lácteas plantean como límites máximos 400 mg/L hacia un cuerpo de agua superficial y 800 mg/L hacia una red de alcantarillado [22]; sin embargo, al considerar que el lactosuero es la fuente de mayor contaminación en esta industria, es muy probable que al mezclarse el residuo final del tratamiento fermentativo con las otras aguas residuales generadas por la misma empresa, se presente un efecto de dilución que permita ajustarse a las normas o que por lo menos requiera un tratamiento final menos exigente, reduciendo los costos implícitos en el mismo.

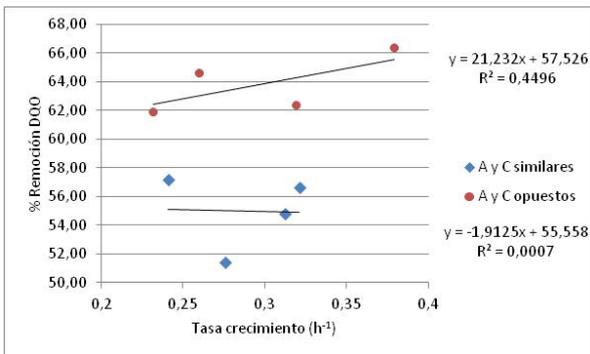
$$y = 59,42 - 4,42AC \quad (2)^*$$

\* Se aplican las mismas condiciones de la Ecuación 1.

La correlación lineal entre las tasas de crecimiento de la levadura y la remoción de DQO manifiesta que para los tratamientos en los que los factores Inóculo (A) y Cantidad de Cosechas (C) se encuentran combinados con niveles opuestos, existe una tendencia con un factor  $R^2$  de 45,0%, lográndose explicar en este porcentaje que los cambios presentados en la remoción de materia orgánica fueron debidos al crecimiento de KM. Esto concuerda con el hecho de que parte de la reducción de la materia orgánica, se invierte en gastos energéticos de sostenimiento de los microorganismos y en la muerte misma de las células [23], que son variantes durante las fases de crecimiento. También se observa que para los tratamientos en los que los niveles de estos dos factores son similares, tanto el factor  $R^2$  (0,0007), como la pendiente de la curva (-1,9) tienden a cero, lo quiere decir que el comportamiento de la remoción de materia orgánica no presenta un patrón definido para dichos tratamientos, y que el valor arrojado por la pendiente de la curva manifiesta una alta insensibilidad a los mismos.



**Figura 3.** Superficie de repuesta para el porcentaje de Remoción de DQO con niveles bajo (a) y alto (b) de cosecha en función de factores Inóculo y Suplemento

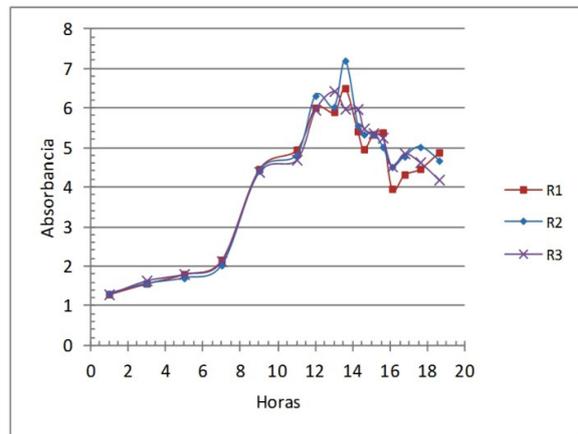


**Figura 4.** Correlación de la Remoción de DQO con las tasa de crecimiento, tomando en cuenta las interacciones de los factores A y C.

Algunos autores han reportado remociones de: 43% para la DQO total y del 91% para la DQO soluble, al incluir adicionalmente un proceso de ultrafiltración [23] (Ghaly, A. y Kamal, M., 2004), luego de 48 horas de fermentación, sin control de temperatura; 71,4% en 24 horas de fermentación a 40°C [24], la que supera en 5,0 % la remoción arrojada por el mejor tratamiento de este estudio, sin embargo, al tomar en cuenta otros factores de tipo económico, como son la duración de los procesos

fermentativos alcanzados (15,4 horas la mayor) y el ahorro de energía por trabajar en el rango de temperatura ambiental del laboratorio, se evidencian ventajas competitivas para la aplicación de la fermentación practicada en éste.

Los ensayos confirmativos por triplicado de las mejores condiciones tanto para el crecimiento de KM como para su influencia en la reducción de la carga orgánica, se establecieron así: Inóculo, 2,2 mg levadura/mL lactosuero; Suplementación: 1,70% de Sulfato de Amonio y Número de cosechas: tres veces, al finalizar la fase exponencial de crecimiento, la cual se extendió hasta cerca de la hora novena de iniciado el proceso (Ver Figura 5). Los resultados arrojados por las variables de respuesta reprodujeron valores similares a los esperados, según los modelos lineales establecidos (Ver la Tabla 1)



**Figura 5.** Monitoreo de Absorbancia durante los ensayos de crecimiento confirmativos.

**Tabla 1.** Valores prácticos y esperados de las variables de respuesta.

Pruebas	Tasa Exponencial Crecimiento ( $h^{-1}$ )	Tasa máxima crecimiento ( $h^{-1}$ )	Remoción DQO (%)
Confirmativas	$0,368 \pm 0,005$	$0,601 \pm 0,098$	$63,5 \pm 2,7$
Exploratorias	$0,379 \pm 0,004$	$0,714 \pm 0,011$	$64,3 \pm 5,8$
Calculado	0,361	--	63,8

## CONCLUSIONES

La optimización de los factores estudiados para la reproducción de *K. marxianus*, favoreció la eficiencia de su crecimiento, ya que se presentaron efectos directos sobre la tasa de crecimiento, presentando la Concentración de Inóculo un efecto de -0,02 al pasar del nivel bajo al alto. Además, el Porcentaje de suplementación presentó interacciones influyentes con los demás factores, lo que conduce a establecer que es deseable utilizar bajo nivel de Inóculo y alto de Suplementación y Cosecha, ya que se obtuvieron las tasas de crecimiento más elevadas, durante la fase exponencial de la reproducción, alcanzando valores de  $0,379 \pm 0,004 h^{-1}$  como promedio y de  $0,714 \pm 0,011 h^{-1}$  como tasa máxima en la misma fase, durante los ensayos exploratorios. Para los ensayos confirmativos la tasa de crecimiento promedio en la fase exponencial fue de  $0,368 \pm 0,005 h^{-1}$ , que superó ligeramente el valor estimado, según el modelo lineal construido que era de  $0,361 h^{-1}$

En cuanto a la remoción de materia orgánica expresada como DQO, a pesar de no haberse presentado efectos directos de los factores estudiados, se pudo verificar con una significancia de 0,054 que las interacciones del Porcentaje de Inóculo y la Cantidad de Cosechas, influyen en la remoción de materia orgánica realizada por el proceso de reproducción de KM. Resultando recomendables tratamientos con niveles cruzados en estos dos factores, es decir, para valores altos de Inóculo, se debe utilizar bajo número de cosechas y, viceversa, obteniéndose remociones entre 61,9 y 66,4% para los tratamientos que cumplieron con esta condición. Los valores finales de DQO estuvieron entre 11600 y 10200 mg/L. La remoción total de materia orgánica, incluyendo el proceso de desproteínización por coagulación térmica fue del orden del 79,6%, lo que manifiesta un parte de satisfacción y una noticia alentadora para la industria quesera, pues se ha comprobado que es totalmente viable el uso de esta tecnología, que podría convertirse en el mediano plazo en una tabla de salvación para este sector, debido a los altos niveles de exigencia de las normativas que se espera que pronto entren en vigencia y que estremecerán a los productores que se resistan a realizar los ajustes pertinentes.

## REFERENCIAS

- Gonzalez Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11. Recuperado de Elsevier Science. ISSN 0960-8524.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi D. N., & Bunko K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14, ISSN 0308-8146, Recuperado de Elsevier Science.
- Berruga, M. I., Jaspe, A. & San Jose, C.(1997). Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(2-4), 119-123, The III International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation, ISSN 0964-8305.
- Padín González, C. y Díaz Fernandez, M. (2006) Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 26(1) p. 35-41. Recuperado de Scielo. ISSN 1315-2556.
- Padín González, C. y Díaz Fernandez, M. (2009) Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* 29(2), 110-116. Recuperado de Scielo. ISSN 1315-2556.
- Zafar, S. & Owais, M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal* 27, 295-298. Recuperado de Elsevier.
- Elkhalifa, A. A. O., El Khateim, H. I., & Abdulla, N. (Dec. 2007). The effect of addition of whey on the acceptability of Tebeldi juice. *Ahfad Journal* 24(2), 123-137. Recuperado de Academic Search Complete. EBSCO.
- Fitzpatrick J. J., Murphy C., Mota F. M. & Pauli T. (2003). Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics. *International Dairy Journal*, 13(7), 575-580, Recuperado de Elsevier Science. ISSN 0958-6946.
- 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(15), 3734-3739. Recuperado de Elsevier Science ISSN 0960-8524.
- Montiel, X., Carruyo, I., Marcano, L y Mavárez, M. (Dic. 2005). Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *Kluyveromyces marxianus* attc 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea. *Revista científica FCV-LUZ*. 15(5), 476-482.
- Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M. & Lyberatos, G. (2008). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47(15), 5227-5233. Recuperado de ACS Publications.
- Güven, G., Perendeci, A., & Tanyolac, A. (2008). Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials* 157 (2008) 69–78. Recuperado de Elsevier Science
- Paez, G., Jimenez, E., Mármol, Z., Ferrer, J., Sulbarán, B., Ojeda, G., ...Rincón, M. (2008). Perfil de aminoácidos de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus*. *INCl*. 33(4), 297-300. Recuperado de Scielo. ISSN 0378-1844.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J. F. y Zucca, J. (1994). Microbiología Alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. (Vol. 1, pp 1-366) Zaragoza: Acribia. ISBN 8420007706.
- Presidencia de la República de Colombia (1984). Decreto 1594.
- Rocha, S. N., Abrahão-neto, J., & Gombert, A. K. (2011). Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(4), 619-630. Recuperado de Proquest.
- Montgomery, D. C (2001). Design and Analysis of Experiments (5a Ed.). New York: John Wiley & Son.
- Otero, M. A.; Saura, G.; Wagner, J. R. y Guerrero, I. (2009). Propagación discontinua de la levadura *Kluyveromyces* sp a partir de suero de queso. *ICIDCA* 43(3), pp 3-7. Recuperado de Redalyc.
- Cori, M. E., Rivas, N., y Dorta, B. (2006). Obtención y Caracterización de dos Concentrados Proteicos a partir de Biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* cultivada en suero lácteo desproteínizado. *Revista Científica (Maracaibo)*. 16(3), 315-324. Recuperado de Scielo.
- Lane, M. M. & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews* 24 (1-2), p. 17- 26. Recuperado de Elsevier Science. ISSN 1749-4613
- Revillion, J.P., Brandelli, A. & Ayub, M. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46(1), 121-127. Recuperado de Scielo. ISSN 1516-8913.
- Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible (2012). Proyecto de norma "Por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales

---

y a sistemas de alcantarillado público, y se dictan otras disposiciones". Revisión V4.0.

23. Ghaly, A. & Kamal, M. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research* 38 (3), 631-644. Recuperado de Elsevier Science. ISSN 0043-1354.
24. Yadav, J., Bezawada, J., Ajila, C., Yan, S., Tyagi, R. & Surampalli, R. (2014). Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology*, 164, 119-127. Recuperado de Elsevier.