



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL

**SIMÓN RODRÍGUEZ**

NÚCLEO REGIONAL POSTGRADO VALENCIA

**EVALUACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA  
PRODUCCION DE ACIDO LACTICO A PARTIR DE  
LACTOSUERO EMPLEANDO *Lactobacillus casei*.**

**Trabajo presentado como requisito parcial para optar al grado de Magister en  
Biotecnología Alimentaria**

**AUTOR:** Ing. Daniel J, Ortiz L.

**TUTOR:** M.Sc. Efraín A, García

**Valencia, 2019**

*“Todos nuestros sueños se pueden volver realidad si  
tenemos el coraje de perseguirlos”.*

*Walt Disney*

## DEDICATORIA

*A Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.*

*A la memoria de mi padre **Francisco Ortiz** que descansa en la gloria de Dios todopoderoso y quien luchó con su trabajo constante para sacar nuestra humilde familia adelante y lograr que sus hijos tuvieran educación y una mejor calidad de vida y sé que desde el cielo aun nos sigue guiando y cuidando, este logro lleva impregnado parte de esa herencia que nos dejaste: **tus valores y principios.***

*A mi madre **Hilda López de Ortiz**, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, por haberme dado la vida que es el tesoro más apreciado del mundo.*

*A mi hija **María de los Angeles.***

*A mis hermanos: **Mireya, William, Alexis, Luis, Coromoto y Lenne** por estar siempre presentes en cada uno de mis logros y por la unión familiar que nos caracteriza. Este logro también es de ustedes.*

*A todos mis sobrinos: **Roccio, Mayerlin, Uvimir, Francisco, Franyerson, Franyelis, Framber, Alexis, Marialexis, Luis, Sebastián, Jeremías, Flavio y Aron**, siempre presentes en mi corazón.*

*A mis compañeros, amigos y familiares. A los que no están físicamente pero siempre y cada día están en el corazón y los recuerdos.*

*A todas las personas que hicieron posible este trabajo,*

***Daniel J. Ortiz L.***

## *AGRADECIMIENTOS*

*A DIOS Todopoderoso por brindarme la oportunidad de obtener otro triunfo personal, y darme salud, sabiduría, y entendimiento para lograr esta meta.*

*A mi querida madre **Hilda López de Ortiz**, por ser mi guía, siempre incondicional y darme siempre su apoyo en todo momento. Gracias por existir, y que DIOS te bendiga siempre.*

*A mi padre **Francisco Ortiz** a pesar de no estar físicamente siempre lo llevo en mis recuerdos y en mi corazón. Bendíceme desde el cielo.*

*A la ilustre y Alma Mater **Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez**, por los conocimientos adquiridos durante el trayecto académico.*

*A todos los profesores de la **UNESR** por sus conocimientos aportados, dedicación, apoyo y valiosa colaboración durante mi formación académica.*

*A personal de la **Fundación CIEPE**, gracias por todas sus atenciones y colaboración prestada.*

*A la **Universidad Politécnica Territorial del Yaracuy "Aristides Bastidas"** por su apoyo prestado para la ejecución de las actividades experimentales.*

*A todos mis compañeros de maestría en especial a mis colegas y amigos: **Barmen, Imeck, y Carlos**, por los momentos compartidos durante todos estos años de estudios.*

*Al profesor **M.Sc Asís Ugarte (Q.E.P.D)**, por sus valiosos conocimientos, Amistad, humildad y sencillez. Dios te tenga en su gloria.*

*A mi tutor **M.Sc. Efraín García**, por su valiosa y excelente colaboración, conocimientos aportados, así como asesoría académica en la ejecución experimental y redacción de este trabajo de grado.*

*A todos mis hermanos, todos mis sobrinos y todos mis familiares, que de alguna manera u otra celebrarán mi éxito.*

*A todos mil gracias y que DIOS los bendiga siempre.*

# **EVALUACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA PRODUCCION DE ACIDO LACTICO A PARTIR DE LACTOSUERO EMPLEANDO *Lactobacillus casei*.**

**AUTOR:** Ortiz Daniel

**TUTOR:** García Efraín

## **RESUMEN**

El suero de leche es uno de los residuos más representativos de la industria lechera y uno de los contaminantes más severos que existen a nivel ambiental. No obstante, la cantidad de lactosa presente en este subproducto hace posible obtener a través de procesos de bioconversión, productos con un alto valor comercial, como el ácido láctico. En este sentido, el objetivo principal de esta investigación consistió en determinar los parámetros cinéticos del proceso de obtención de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*. Es necesario suplementar el lactosuero con el fin de aportar a las bacterias los nutrientes necesarios que son fundamentales para su crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, el medio fue enriquecido con lactosa como fuente principal de carbohidrato, con el fin de optimizar el consumo, por parte de las bacterias fermentadoras de la lactosa, en el lactosuero entero y desproteinizado. Con los resultados obtenidos experimentalmente se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo 2x4 con un factor a dos niveles (lactosuero entero y desproteinizado) y otro factor concentración de lactosa a 4 niveles (0, 1, 5 y 10%), con 4 repeticiones por cada tratamiento para un total de 32 unidades experimentales, obteniendo de esta manera el efecto combinado de los factores para establecer los valores óptimos de la cinética de producción de ácido láctico en relación a concentración de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto. El procesamiento de los datos y su análisis se realizó empleando el software estadístico MINITAB 18. El lactosuero entero y desproteinizado, se encontró dentro de los intervalos fisicoquímicos aceptables para el proceso de fermentación. El lactosuero desproteinizado al 1% de lactosa, arrojó el valor de acidez más alto (10 g/l de ácido láctico), el mayor y rendimiento en biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{x/s}$ ) se obtuvo en el lactosuero entero enriquecido al nivel de concentración de lactosa correspondiente al 10% (39,5 g de biomasa por cada gramo de sustrato consumido), observándose que la concentración de biomasa aumenta con la concentración de lactosa, la mayor producción volumétrica (Q), se obtiene en el lactosuero desproteinizado enriquecido al 1% de lactosa (1,39 g/l de ácido láctico. hora). Se logró obtener mayores conversiones de lactosa en el lactosuero entero y desproteinizado enriquecidos al 1 % de lactosa (52,64 y 39,78% respectivamente). No obstante, altas concentraciones de lactosa inhiben la producción de ácido láctico.

**Palabras clave:** Parámetros cinéticos, lactosuero, *Lactobacillus casei*.

## ABSTRACT

Whey is one of the most representative residues of the dairy industry and one of the most severe pollutants that exist at the environmental level. However, the amount of lactose present in this by-product makes it possible to obtain, through bioconversion processes, products with a high commercial value, such as lactic acid. In this sense, the main objective of this research was to determine the kinetic parameters of the process of obtaining lactic acid from whey using *Lactobacillus casei*. It is necessary to supplement the whey in order to provide the bacteria with the necessary nutrients that are essential for their growth and development. Therefore, the medium was enriched with lactose as the main source of carbohydrate, in order to optimize the consumption, by the fermenting bacterium of lactose. With the results obtained experimentally, a completely randomized design was established with a complete factorial arrangement 2x4 with a factor at two levels (whole and deproteinized whey) and another factor concentration of lactose at 4 levels (0, 1, 5 and 10%), with 4 repetitions per treatment for a total of 32 experimental units, obtaining in this way the combined effect of the factors to establish the optimal values of the kinetics of lactic acid production in relation to biomass concentration, substrate consumption and product formation. The processing of the data and its analysis was carried out using the statistical software MINITAB 18. The whey whole and deproteinized, was found within the physicochemical ranges acceptable for acidification. The whey deproteinized to 1% of lactose, gave the highest acid value (10 g / l of lactic acid), the highest and yield in biomass with respect to the substrate ( $Y_x / s$ ) was obtained in the whole whey enriched at the level of lactose concentration corresponding to 10% (39,5 g of biomass per gram of substrate consumed), observing that the concentration of biomass increases with the concentration of lactose, the highest volumetric production ( $Q$ ), is obtained in the deproteinized whey enriched with 1% lactose (1,39 g / l of lactic acid, hours). It was possible to obtain higher conversions of lactose in the whole and deproteinized whey enriched with 1% lactose (52,64 and 39,78% respectively). However, high concentrations of lactose inhibit the production of lactic acid.

**Key words:** Kinetic parameters, whey, *Lactobacillus casei*.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b>	<b>Pág.</b>
	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	IV
<b>RESUMEN</b>	V
<b>ABSTRAC</b>	VI
<b>LISTA DE TABLAS</b>	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XI
<b>I INTRODUCCION</b>	13
<b>II OBJETIVOS</b>	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
<b>III JUSTIFICACION</b>	17
<b>IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	19
<b>V REVISION BIBLIOGRAFICA</b>	22
5.1 Antecedentes	22
5.2 Bases teóricas	31
5.2.1 Fermentación láctica	31
5.2.2 Producción biotecnológica de ácido láctico	31
5.2.3 Producción industrial	33
5.2.4 Usos y especificaciones	36
5.2.5 Definición, composición y tipos de lactosuero	37
5.2.6 <i>Lactobacillus casei</i>	38
5.2.7 Requerimientos nutricionales	40
5.2.8 Micronutrientes	40
5.2.9 Factores que afectan el crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	40
5.2.10 Fuente, aislamiento conservación de <i>Lactobacillus casei</i>	41
5.2.11 Aislamiento del <i>Lactobacillus casei</i> proveniente de leches fermentadas.	42
5.2.12 Cinética de crecimiento	43
5.2.13 Crecimiento en cultivo discontinuo	44
5.2.14 Efecto de la concentración de sustrato	46
5.2.15 Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de crecimiento	46
5.2.16 Cinética de crecimiento celular (Ecuación de Monod)	46
5.2.17 Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )	47
5.2.18 Velocidad específica de crecimiento máxima	47
5.2.19 La constante específica de cada sustrato	47
5.2.20 Sustrato limitante	47
5.2.21 Cinética del consumo de sustrato	48
5.2.22 Cinética de formación de producto	49
5.2.23 Cinética y balances principales en un biorreactor	49

5.2.24 Estequiometria	51
<b>VI METODOLOGIA</b>	56
6.1 Diseño de la investigación	56
6.2 Localización	56
6.3 Materiales	57
6.3.1 Población y muestra	57
6.3.1.1 Caracterización del lactosuero (Medio de cultivo)	57
6.4 Activación del microorganismo y mantenimiento del cultivo	57
6.5 Adaptación del microorganismo	57
6.6 Pretratamiento de los lactosueros	57
6.7 Proceso de fermentación	58
6.8 Seguimiento de la fermentación	58
6.8.1 Consumo de sustrato	59
6.8.2 Biomasa	59
6.8.3 Acidez desarrollada	59
6.8.4 Contenido de nitrógeno y proteína	59
6.8.5 Contenido de humedad	60
6.8.6 Densidad	60
6.8.7 Contenido de solidos totales	60
6.9 Estimación de parámetros cinéticos	60
6.9.1 Rendimiento observado de sustrato en producto ( $Y_{p/s}$ ).	60
6.9.2 Productividad Volumétrica (Q).	61
6.9.3 Rendimiento observado de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s}$ )	61
6.10 Procesamiento y análisis	61
6.11 Diseño estadístico	61
6.12 Elaboración de las formulaciones (tratamientos)	62
<b>VII RESULTADOS Y DISCUSION</b>	63
<b>VIII CONCLUSIONES</b>	84
<b>IX RECOMENDACIONES</b>	85
<b>X BIBLIOGRAFIA</b>	86
<b>ANEXOS</b>	91



## LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
1	Caracterización de suero entero y suero clarificado.	24
2	Producción de ácido láctico a partir del lactosuero suplementado.	27
3	Propiedades del ácido láctico.	33
4	Composición de lactosuero dulce y ácido.	37
5	Composición química del agar MRS.	43
6	Tratamiento estadístico (Arreglo factorial 2x4) de la evaluación de los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando <i>Lactobacillus casei</i> .	62
7	Resultados de la caracterización fisicoquímica de los lactosueros.	63
8	Producción de ácido láctico (g/l), en función del tiempo de fermentación de ambos lactosueros (entero y desproteinizado) empleando <i>Lactobacillus casei</i> .	65
9	Análisis de varianza de los resultados obtenidos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero desproteinizado(A) y entero (B).	67
10	Consumo de Lactosa (g/l) en lactosuero entero y desproteinizado en función del tiempo de fermentación empleando <i>Lactobacillus casei</i> .	70
11	Análisis de varianza de los resultados obtenidos del consumo de lactosa en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B)	72
12	Producción de Biomasa expresada como peso seco (g/l) durante el periodo de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado, empleando <i>Lactobacillus casei</i> .	74

13	Análisis de varianza de los resultados obtenidos de la concentración de biomasa en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).	76
14	Parámetros Cinéticos: $Y_{x/s}$ (Rendimiento en biomasa con respecto a ácido láctico producido), $Y_p/s$ (Rendimiento de ácido láctico a partir del sustrato), $Y_p/x$ (Rendimiento de ácido láctico con respecto a la biomasa), consumo de lactosa y producción volumétrica de ácido láctico después de 72 horas de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado empleando <i>Lactobacillus casei</i> .	80
15	Variación del pH después de 72 horas de Fermentación en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.	83

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
1	Curva de crecimiento típica. Fases del crecimiento cinético celular.	45
2	Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según la ecuación de Monod.	48
3	Producción de ácido láctico (g/l) en función del tiempo para lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.	65
4	Diagrama de Pareto. Nivel de significancia para la aceptación o rechazo de los factores y su interacción de los resultados obtenidos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).	68
5	Acidificación con <i>Lactobacillus casei</i> debido al efecto combinado, el tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B) y concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%).	68
6	Efecto de la interacción del tipo de lactosuero Entero(A), Desproteinizado (B); y del porcentaje de concentración de lactosa suplementada en la acidificación (% de ácido láctico).	69
7	Efecto de la conversión de lactosa en ácido láctico, a través del tiempo de fermentación, a partir de lactosuero entero (LE) y desproteinizado (LD).	70
8	Diagrama de Pareto. Nivel de significancia $\alpha = 0,05$ , para la aceptación o rechazo de los factores y su interacción de los resultados obtenidos del consumo de lactosa con <i>Lactobacillus casei</i> para lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).	72
9	Disminución (Conversión) de lactosa con <i>Lactobacillus casei</i> debido al efecto combinado del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B) y concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%).	73

10	Efecto de la interacción del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B); y del porcentaje de concentración de lactosa suplementada en el consumo de lactosa a partir de <i>Lactobacillus casei</i> .	73
11	Efecto de la producción de biomasa a través del tiempo de fermentación, a partir de lactosuero entero (LE) y desproteinizado (LD).	74
12	Diagrama de Pareto. Nivel de significancia para la aceptación o rechazo de los factores y su interacción de los resultados obtenidos de la producción de biomasa con <i>L. casei</i> para lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).	77
13	Efecto de la interacción del tipo de lactosuero Entero(A), desproteinizado (B); y de la concentración de lactosa en la producción de biomasa.	77
14	Producción de biomasa con <i>L. casei</i> debido al efecto combinado del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B) y concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%).	78
15	Rendimiento en biomasa en función del sustrato consumido(lactosa) después de 72 horas de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.	80
16	Rendimiento de ácido láctico en función del sustrato consumido (lactosa) después de 72 horas de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.	81
17	Rendimiento de ácido láctico en función de la biomasa después de 72 horas de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.	81
18	Consumo de lactosa después de 72 horas de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.	82
19	Producción volumétrica de ácido láctico después de 72 horas de fermentación.	82
20	Variación del pH después de 72 horas de Fermentación del lactosuero( Entero y desproteinizado), empleando <i>L.casei</i> .	83

## I INTRODUCCION

El suero de leche es uno de los residuos más representativos de la industria lechera y uno de los contaminantes más severos que existen a nivel ambiental. El suero es definido como un líquido remanente tras la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso y constituye aproximadamente el 85 – 90 % del volumen de la leche, cuyos componentes principales como la lactosa, calcio, sales minerales y proteínas lactoséricas de bajo peso molecular solubles en su punto isoelectrico son retenidas en un 55%, ya que no reaccionan con el cuajo. El contenido en lactosa está entre 42 y 52 g/l, representando este el 70% del contenido total del conjunto de sólidos presentes. El lactosuero es, uno de los desechos más contaminantes de la industria de alimentos ya que por cada Kg. de queso elaborado se crean 9 litros de suero, estimando que anualmente a nivel mundial se generan 110 millones de toneladas (Verónica, 2003).

Actualmente, la producción de lactosuero se constituye en un problema ambiental; si se consideran los altos volúmenes producidos, su vertimiento en fuentes naturales de agua o en suelos sin haber sido sometido a tratamiento y sin considerar su carácter contaminante, dada la cantidad de nutrientes que posee. Sólo una parte de lactosuero producido es aprovechado adecuadamente, aproximadamente el 47% de las 115 millones de toneladas de lactosuero producido a nivel mundial son desechadas al ambiente sin tratamiento previo, lo que además de ocasionar un gran daño ecológico, también representa una pérdida significativa de recursos (Guerrero *et al.*, 2012).

La producción quesera industrial para el año de 2005 en Venezuela puede estimarse en unos 400 millones de kilos; por lo que puede deducirse que el suero residual alcanza la cifra de 3.600 millones de litros. La legislación venezolana vigente prohíbe la eliminación de suero en cursos de agua y estanques. También trae problemas encauzarlo en zanjias y lagunas construidas para tal fin pues el ácido láctico impermeabiliza el suelo, formándose así, espejos putrefactos que inciden negativamente en la conservación del ambiente (Caminotti, 1993).

Como consecuencias de su inadecuada disposición, en los suelos se produce saturación de los mismos y en las aguas, debido a la presencia de alto contenido de nutrientes en el lactosuero, se genera un contenido de materia orgánica del 40 al 60 g/l de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y entre 50 y 80 g/l de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de lactosuero líquido, siendo la lactosa el principal componente de los sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO.

En este sentido, siendo la lactosa el principal componente del lactosuero, a través de procesos de bioconversión pueden obtenerse a partir de este, productos con un alto valor comercial, uno de estos productos es el ácido láctico. El ácido láctico es un ácido orgánico valorado por su aplicación en la industria de alimentos, farmacéutica, química y su potencial como materia prima para la producción de polímeros biodegradables. Por lo tanto, la producción biotecnológica de ácido láctico ha adquirido gran importancia industrial con respecto a la síntesis química debido a que usa materias primas renovables y es amigable con el ambiente. En décadas recientes las investigaciones están direccionadas a optimizar la producción de ácido láctico con la premisa de lograr mayor productividad, rendimientos y bajo costo (García, 2010).

Los Microorganismos Eficientes (EM) fueron desarrollados en la década de los 70 y están conformados esencialmente por tres diferentes tipos de organismos: levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias fotosintéticas, las cuales desarrollan una sinergia metabólica que permite su aplicación en diferentes campos de la ingeniería. Las principales aplicaciones a nivel industrial se han concentrado en el aprovechamiento de suelos, residuos agropecuarios y tratamientos de aguas.

Uno de los microorganismos representativos de las bacterias ácido lácticas es el *Lactobacillus casei*, empleado para la recuperación de ácido láctico a partir del suero lácteo y que puede ser considerado para la regeneración de otros macrocompuestos presentes en el suero. La medición del crecimiento del microorganismo, el consumo del sustrato y la producción del ácido fundamenta la determinación de los parámetros que describen el bioproceso.

Por tal motivo, la presente investigación tuvo como propósito fundamental la evaluación de los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*, lo que permitió caracterizar dicho proceso basado en tres variables importantes como concentración de biomasa, sustrato y formación de producto, además del aprovechamiento de este subproducto generado por la industria láctea, lo que permitirá a futuro crear estrategias de recuperación a otras empresas destinada a la elaboración de queso, cuyo lactosuero generado por estas, sea aprovechado a través de procesos biotecnológicos para la generación de productos como el ácido láctico y como consecuencia la disminución del impacto ambiental que genera este residuo, si no es tratado ajustado a las normas ambientales nacional e internacional.

## II OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General:

- Evaluar los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Seleccionar y caracterizar lactosuero (entero y desproteinizado) mediante análisis físicos y químicos.
- Evaluar la cinética de producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *lactobacillus casei*.
- Analizar estadísticamente los resultados obtenidos de la cinética de producción de ácido láctico mediante un arreglo de tipo factorial, en lo referente a la formación de producto y biomasa, así como el consumo de sustrato a través del tiempo.



### III JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas ha aumentado la preocupación por la conservación del ambiente tanto en las industrias como en las actividades urbanas debido a los crecientes efectos que ha causado la emisión de contaminantes al aire, agua y suelo. Los procesos llevados a cabo en la industria quesera generan importantes consumos de agua y energía, así como grandes volúmenes de aguas residuales con carga orgánica elevada, residuos sólidos como plásticos, papeles, maderas utilizados en el envasado, lodos, emisiones atmosféricas, ruidos y malos olores se obtienen; sus características dependen de la tecnología utilizada, de las operaciones y el manejo de cada instalación (CNPMLS, 2002).

Un sistema que permita reducir la generación de contaminantes incluye modificación en origen de cualquier proceso, instalaciones, composición del producto, sustitución y reciclaje de materias primas y productos que conduzcan a disminuir las corrientes residuales tanto en el proceso productivo como en etapas posteriores a su producción; la valorización y aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos mediante la utilización de técnicas apropiadas permite reducir su elevada carga orgánica y generar valor agregado a los mismos (IDF, 1997; Restrepo, 2006).

La aplicación de un programa de prevención de la contaminación en la industria quesera se inicia con la implementación de mejoras en las prácticas utilizadas (Buenas Prácticas de Manejo) y un mantenimiento preventivo y correctivo apropiado debido a que el 90- 95 % de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de los efluentes de estas empresas provienen de las pérdidas de productos, principalmente lactosuero; por lo tanto el control de este, es un elemento de alto valor estratégico para lograr con éxito la reducción de la contaminación cumpliendo con la normativa ambiental vigente (Ley Orgánica del Ambiente, 2006).

El diseño de alternativas para los efluentes generados contempla remover los niveles contaminantes de parámetros tales como demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), aceites, grasas, sólidos suspendidos, corrección de pH a valores permitidos en la legislación (Ley Penal del Ambiente, 1992; Venezuela, 1995), convirtiéndolo en inocuo para el medio ambiente y la salud humana.

El vertimiento directo del lactosuero a los cursos de agua sin un tratamiento previo genera un problema de contaminación ambiental debido a la materia orgánica constituida por 4,8% de lactosa, 0,75% de proteínas y 6,2% de materia seca (Oreopoulou y Russ, 2007), nutrientes valiosos al momento de aprovecharlos como alimento y medio de cultivo para fermentaciones industriales. Estas condiciones de disponibilidad y oportunidades del mercado hace necesaria la búsqueda de mecanismos para lograr un aprovechamiento del lactosuero mediante la extracción de nutrientes o su transformación en insumos o aditivos alimentarios y plantear alternativas de producción limpia, útil para el medio ambiente y que genere valor al lactosuero mediante su potencial uso como medio para la obtención de ácido láctico a partir de *Lactobacillus casei*.

La aplicación de procesos biotecnológicos permite obtener sustancias con interesantes aplicaciones en la industria de alimentos, química y farmacéutica. La producción microbiana de ácido láctico tiene un gran interés en los últimos años y el uso de lactosuero como sustrato para producir ácido láctico por fermentación es favorable por el bajo costo y alto contenido de materia orgánica. Por tales razones, el propósito de esta investigación consistió en evaluar los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*, como alternativa para el aprovechamiento de los nutrientes que contiene este subproducto, principalmente lactosa para la producción de ácido láctico, de modo que sea posible desarrollar una tecnología que permita reducir los niveles de contaminación e impacto ambiental que causa su vertido en las aguas.

#### **IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El queso es un producto fundamental de la industria láctea, la cual utiliza un 25% del total de la producción mundial en su elaboración; en Venezuela se destina a la producción del mismo el 62,9 % de la producción nacional, el 28,9 % lo utiliza las grandes industrias, las pequeñas y medianas industrias también llamadas semi industriales y artesanales procesan el 17 % cada una de ellas lo que indica que este producto y su proceso de elaboración es el más importante al momento de evaluar los aspectos medioambientales asociados, más aun cuando este aspecto acumulado en las pequeñas y medianas empresas es comparable o incluso superior al de las grandes empresas ya que las mismas no aplican criterios medioambientales en sus operaciones y además no suelen ser el foco de atención de la población y organismos rectores (IDF, 1987; Saizar, 2004; CAVILAC, 2008 ).

Los productores de queso están enfrentados a las regulaciones encaminadas a prohibir el vertimiento de éste en fuentes naturales, por su carácter corrosivo y alta carga de materia orgánica. Por lo tanto, en los últimos años se ha dado la necesidad de conocer su naturaleza, composición y valor nutricional; para concentrarlo o modificarlo y darle un uso apropiado como ingrediente, fuente de nutrientes y fuente de otros derivados o compuestos de interés o en caso contrario someterlo a tratamientos o transformaciones biológicas encaminadas a su descontaminación (Pelayo, 2009).

La industria láctea es uno de las mayores contaminantes del agua, especialmente en la elaboración de quesos, debido al componente residual denominado lactosuero. Durante la coagulación de la leche, presentada en todo proceso industrial donde se produzca queso, caseína o coprecipitados, se obtendrá un subproducto que se puede convertir en un problema ambiental importante: el lactosuero o suero de leche; líquido claro de color amarillo verdoso, obtenido al separar la leche en dos fases: la cuajada, que posteriormente es escurrida y prensada dando lugar al queso y el líquido resultante que representa del 80 al 90% del volumen

de leche tratada de la cual contiene el 50% de los nutrientes; obteniéndose cantidades 7 a 10 veces mayores de lactosuero que de queso producido (Monsalve y Gonzales, 2005). También se dice que el suero es la fase acuosa de la leche, obtenida por medio de acidificación, aplicación de calor o coagulación enzimática (Gutiérrez, 2006).

El lactosuero se constituye en el principal residuo de la industria láctea, pues solo una parte de este es usado para alimentación animal o es procesado, pero el resto es tratado como un desecho; de manera que, aproximadamente, 47 % de las 115 millones de toneladas de lactosuero, producido a nivel mundial, fueron desechadas sin tratamiento previo al ambiente, en ríos, lagos o en el suelo, lo que además de ocasionar un gran daño, también representa una pérdida significativa de recursos (Guerrero *et al*; 2012). El no darle un uso adecuado al lactosuero, crea un enorme desperdicio de nutrientes que pueden ser aprovechados en la alimentación humana; se estima que en términos de composición y de valor energético, los sólidos del lactosuero son comparables a la harina de trigo (357 Kcal/100 g), lo que hace un alimento con mucho potencial. (Inda, 2000; Laguna, 2011).

El alto contenido de nutrientes que genera aproximadamente con un contenido de materia orgánica entre 40 y 60 g/l de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y entre 50 y 80 g/l de demanda química de oxígeno (DQO) de lactosuero líquido (Guerrero *et al*; 2012), se compone principalmente de lactosa, proteínas, grasas y minerales; siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Ghaly y Kamal, 2004).

El uso que tradicionalmente se le ha dado a este subproducto, es suministrarlo como alimento a los animales domésticos especialmente cerdos. Cuando el productor de queso no encuentra otra forma de utilizarlo, escoge esparcirlo a las fuentes de agua o al suelo, causando deterioro del medio ambiente y desaprovechamiento de un nutriente proteico potencialmente útil en la alimentación humana (Gómez *et al*; 2010).

Este gran contenido de nutrientes del lacto suero produce aproximadamente 3,5 Kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 Kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 Kg de lacto suero producido, valores de 5,0 Kg de DBO y 10 Kg de DQO se obtienen al tener aumento en las pérdidas de finos por defectos de coagulación siendo la lactosa la responsable de un 70 a 80 % de los valores obtenidos; la transformación de 100.000 litros de leche / día en quesos genera una contaminación equivalente a una población de 55.000 a 65.000 habitantes (Berruga, 1999), por lo tanto es conveniente que se haga una revisión sobre los usos potenciales del suero aplicando procesos industriales que se centren en la eliminación de agua, recuperación de sales minerales, lactosa y proteínas generando por lo tanto el principio de que la utilización industrial del lactosuero va a depender del componente del mismo que se quiera aprovechar para evitar tener que desecharlo como efluente con el alto costo que esto representa (Valencia y Ramírez, 2009).

En este sentido, el significativo contenido de lactosa del lactosuero lo transforman en una materia prima de alto interés para la producción de ácido láctico, utilizado a su vez especialmente en productos alimenticios, químicos, cosméticos y farmacéuticos. El considerar esta situación, conlleva a la búsqueda de mecanismos para lograr un aprovechamiento del lactosuero mediante la extracción de nutrientes o su transformación en insumos o aditivos alimentarios y a plantear y analizar alternativas como la propuesta en la presente investigación, cuyo objetivo consistió en evaluar los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*.

La finalidad de este trabajo es plantear una alternativa adecuada para el manejo residual del lactosuero del sector lácteo, con el fin de evitar el derrame de estos residuos a las aguas residuales sin tratamiento previo, y así reducir la contaminación por DBO y DQO. De esta manera, los residuos de la producción de queso pasan a tener un valor agregado con la implantación de un proceso económico y práctico que contribuye a la minimización del impacto ambiental.

## V REVISION BIBLIOGRAFICA

### 5.1 Antecedentes

A continuación se señalan algunas investigaciones publicadas, que debido a su asociación con el contenido del presente estudio, sirvieron de base para orientar la investigación.

María E. *et al* ( 2016), estudiaron el uso de lactosuero de cabra como medio de crecimiento para la obtención de biomasa de *Lactobacillus*, el lactosuero se obtuvo por medio de la elaboración de queso fresco de cabra a escala de laboratorio, el cual fue caracterizado físico-químicamente y se determinó el contenido de micro y macro nutrientes de interés.

El proceso de obtención de biomasa de *Lactobacillus* se realizó vía fermentación en un biorreactor en condiciones fijas de operación a temperatura de 30 °C y 300 rpm, inoculado con bacterias del género *Lactobacillus* aisladas de yogur natural por resiembra de bacterias en tubo inclinado y placa de Petri en condiciones de microaerofilia, se identificó su morfología celular por microscopía, caracterizando la especie por pruebas de tinción de Gram y catalasa.

Seguidamente, se realizaron ensayos de fermentación con lactosuero de cabra íntegro y enriquecido para determinar la curva de crecimiento en un período de treinta horas. Para lograr esto se realizaron muestreos cada quince minutos las dos primeras horas y cada dos horas hasta el final de la fermentación.

Se registraron los datos para la curva de crecimiento y se determinó tanto el rendimiento estimado, como la productividad promedio de biomasa de los experimentos de fermentación para lactosuero íntegro y lactosuero enriquecido. Los datos experimentales obtenidos para la etapa de crecimiento exponencial, fueron ajustados al modelo logístico para determinar la tasa específica de crecimiento.

La máxima concentración de biomasa de *Lactobacillus* obtenida para el medio lactosuero integro (LSI) fue de 2,9 g/l a las doce horas de fermentación, mientras que para lactosuero enriquecido 1 (LSE1) fue de 3,99 g/l a las dieciocho horas, por ultimo para lactosuero enriquecido 2 (LSE2) se obtuvo 4,5 g/l a las dieciséis horas, por lo tanto existió una mayor concentración de biomasa de *Lactobacillus* en este último medio. El medio LSE2 presentó el mayor rendimiento estimado de biomasa producida con un valor de 0,0643, siendo 1,19 y 1,13 veces mayor con respecto a LSE1 y LSE2 respectivamente.

La productividad promedio obtenida para cada medio fermentativo fueron: 0,2741, 0,2429 y 0,2393 (g/l.h) para LSI, LSE1 y LSE2 respectivamente, lo que indica que el LSI sin necesidad de enriquecimiento es el medio de crecimiento más productivo. Igualmente, la tasa específica de crecimiento más alta se obtuvo para el medio LSI, equivalente a  $0,4717\text{ h}^{-1}$ , el cual es 1,8 veces mayor que para los medios LSE1 y LSE2.

John V *et al*; (2015), evaluaron el crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 en suero clarificado, para lo cual estudiaron el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de este lactobacillus, cultivado en suero de leche clarificado en fermentación por lotes. Se observó el efecto de los factores sobre la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa, utilizando para cada parámetro evaluado la metodología de superficie de respuesta, empleando un diseño central compuesto notable  $2 \times 2$ . Los resultados obtenidos del modelo para maximizar la velocidad de crecimiento específica a  $0,061\text{h}^{-1}$  el proceso debe ser realizado a pH cercano de 7,1 y temperatura de  $36,9^{\circ}\text{C}$ , y para maximizar la producción de biomasa a 11,58 g/l debe realizarse a pH de 7,0 y temperatura de  $35,7^{\circ}\text{C}$ , estos resultados ratifican el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei*.

En cuanto a la composición del suero de leche, en el cuadro siguiente, se muestra la caracterización de suero entero y clarificado, en ella se observa una disminución aproximada del 10% en la cantidad de sólidos, cerca del 45% en el

contenido de nitrógeno y proteínas, además de la disminución de una tercera parte del contenido de calcio, mientras que la lactosa no presentó cambios aparentes en la concentración después de la desproteinización.

Tabla 1. Caracterización de suero entero y suero clarificado.

Parámetros	Suero entero	Suero clarificado
°Brix	7,2	2,5
pH	6,57	5,71
Densidad	1,029	1,029
% Nitrógeno	0,20	0,11
% Proteínas	1,28	0,70
Lactosa (g/l)	43,5	43,7
Calcio( g/l)	0,313	0,223

Por otro lado, Cury *et al*; (2014) evaluaron la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei*. El objetivo de esta investigación fue evaluar el proceso de fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) con *Lactobacillus casei*, utilizando diferentes porcentajes de su inóculo. Se caracterizaron fisicoquímicamente los lactosueros, sometiéndolos a fermentación anaeróbica a 37°C y 120 rpm por 96 h. Se evaluó la concentración de biomasa celular, el consumo de lactosa, la producción de ácido láctico (AL) y se estimaron los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x3, empleando la metodología de medidas repetidas.

Los datos, se procesaron a través de los paquetes estadísticos SAS versión 9 y Statgraphics Centurión XVI. El lactosuero, entero y desproteinizado, se encontró dentro de los intervalos fisicoquímicos aceptables para su acidificación. Los valores de acidez fueron superiores a 120 Grados Dornic (120°D) con la inoculación de *L. casei*, excepto en lactosuero desproteinizado, inoculado con 15% de cultivo.



El lactosuero entero con 15% de inóculo, alcanzo 120°D en el menor tiempo (34 h). Altas concentraciones de inóculo (15%) favorecieron la acidificación en el lactosuero entero, mostrando la mayor producción (20,83 g ácido láctico/litro), coeficiente de rendimiento ( $Y'_{p/s}=0,86$ ),  $Q_p=0,173$  g de ácido láctico/litro. hora; mientras el lactosuero desproteinizado mostró un mayor crecimiento microbiano, menor conversión de lactosa (8,2%) y menor producción media de ácido láctico (8,19g/l).

Por otro lado, Henry J, (2014), determino los parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos (MRS y Pro). En cada medio se evaluó el máximo crecimiento en relación con producción de biomasa, conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), determinación de pH, consumo de azúcares totales (mg/l) y producción de ácido láctico (%). Se usó un diseño de bloques al azar con dos tratamientos (medios Pro y MRS), 11 bloques correspondientes a los tiempos de evaluación y 2 réplicas por cada uno. La prueba se efectuó cada 2:24 horas durante un día; se obtuvo la fase exponencial de crecimiento (UFC/ml) al tiempo 7 (16:48 horas) y tiempo 6 (14:24 horas) de la cinética, alcanzando valores de  $3,0 \times 10^{11}$  y  $7,3 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente, y una concentración de proteínas de 46,95 g/l y 45,83 g/l para el tiempo 7 y 6 respectivamente. Los resultados estadísticos no encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P>0,05$ ).

En el mismo orden de ideas, Carlos *et al*; (2013), obtuvieron ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. El lactosuero se aprovechó como materia prima para la obtención de ácido láctico. Se estudió el efecto de las variables concentración inicial de lactosa y sulfato de amonio como suplementos del lactosuero en la producción del ácido láctico.

Se obtuvo una productividad máxima de  $1,1 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  en ácido láctico. El coeficiente de rendimiento  $Y_{p/s}$  varió de 0,5306 - 0,2488 g. l<sup>-1</sup> para 47,9 g.l<sup>-1</sup> y 87,72

g.l<sup>-1</sup> de lactosa inicial. La producción se asoció con el crecimiento del *Lactobacillus casei* durante sus fases, donde utilizó entre el 84,0 al 77,4% de lactosa después de 21 horas de fermentación.

Las mejores producciones se obtuvieron a niveles bajos de sulfato de amonio, y a niveles altos se requiere mayor suplementación con lactosa inicial; sin embargo, altas concentraciones de nitrógeno en el medio no favorecen la producción de ácido láctico.

El *Lactobacillus casei* creció con un alto rendimiento en ácido láctico, que se redujo al incrementarse la concentración inicial de lactosa (fuente de carbono) y de sulfato de amonio (fuente de nitrógeno) en el medio; de tal forma, que el lactosuero requiere una mayor suplementación con fuentes de nitrógeno que de carbono.

En la tabla 2 se muestra los tratamientos evaluados para producir ácido láctico a partir de lactosuero suplementado y los valores medios de producción de ácido láctico (P), concentración de *L. casei* (N) y consumo de lactosa (%) a las 21 horas de fermentación. En el análisis de varianza, los resultados muestran que la suplementación con sulfato de amonio es estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ), mientras la variable lactosa no es significativo su efecto sobre la producción de ácido láctico.

Estos resultados muestran que *L. casei* fue capaz de producir ácido láctico al suplementar con lactosa y sulfato de amonio. El tratamiento 2 presentó la mayor producción de ácido láctico, con una suplementación de 5 g. l<sup>-1</sup> de sulfato de amonio y 9,38 g. l<sup>-1</sup> de lactosa para una producción de 21,46 g. l<sup>-1</sup> de ácido láctico. La producción más baja de ácido láctico en el tratamiento 4 (13,76 g. l<sup>-1</sup>) fue obtenida con una concentración de 11,99 g. l<sup>-1</sup> de sulfato de amonio y 79,63 g. l<sup>-1</sup> de lactosa inicial.

Tabla 2. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero suplementado.

Variable de	Suplemento							
Estudio								
Tratamiento	So	L	Lo	P	N	Consumo	Y x/s	Yp/s
	(g/L <sup>-1</sup> )	(g/L <sup>-1</sup> )	(g/L <sup>-1</sup> )	(g/L <sup>-1</sup> )	(logUFC .ml <sup>-1</sup> )	lactosa (%)	(logUFC.g <sup>-1</sup> )	
1	2,62	1,27	47,9	17,89	5,42	87,5	0,255	0,530
2	5	9,38	55,88	21,46	7,32	87,4	0,218	0,451
3	8,5	21,25	67,75,	17,87	7,61	84	0,173	0,328
4	11,99	33,13	79,63	13,76	7,62	79,1	0,168	0,278
5	14,37	41,22	87,72	20,86 b	8,39	77,4	0,156	0,248

**So:** Suplementación con sulfato de amonio, **L:** concentración de lactosa, **Lo:** concentración de lactosa inicial **P:** producción de ácido láctico **N:** concentración de Biomasa **Yp/s:** Rendimiento de ácido láctico **Y x/s:** Rendimiento en biomasa

Fuente: Carlos *et al.*, (2013).

Entre los tratamientos 1 y 5 se encuentra la variación máxima y mínimo de rendimiento (Yp/s) mostrando una reducción del 53,1%, asociado a la máxima (8,39 log UFC. ml<sup>-1</sup>) y mínima (5,42 log UFC. ml<sup>-1</sup>) concentración de biomasa. Esto confirma la influencia que tiene el balance de nutrientes del medio en la tendencia a producir biomasa o convertirlos preferentemente en ácido láctico. El rendimiento de ácido láctico (Yp/s) decrece con el aumento de la concentración de lactosa. Los resultados muestran la asociación existente entre la producción de biomasa y de ácido láctico; además, de que altas concentraciones de lactosa no favorecen directamente el crecimiento microbiano o la formación de producto.

De igual manera, Alexandra *et al.*; (2012) analizaron un método de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de producción de ácido láctico a partir de subproductos lácteos. Mediante un diseño experimental 2k combinado con un diseño

compuesto central y un análisis de superficie de respuesta se optimizó la producción de ácido láctico (AL) a partir de suero de leche de caprino (SLC) como sustrato principal y se determinó la combinación de los efectos de la concentración de tres nutrientes: riboflavina, extracto de levadura y sulfato de amonio.

Según el experimento realizado (confiabilidad; 95%) existe evidencia que tanto la temperatura y la concentración del complemento como la interacción de ambos inciden en la producción de ácido láctico (AL), que se obtiene al fermentar suero de leche de caprino. Las mayores producciones de ácido láctico 23,68 g/litro y crecimiento bacteriano se obtuvieron con mayores concentraciones de los nutrientes a una temperatura de 42 °C.

Por otro lado, Escobar *et al*; (2010) evaluaron el crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. El *Lactobacillus casei* es un microorganismo que se utiliza como probiótico ya que genera actividad antagónica contra patógenos causantes de desórdenes gastrointestinales, debido a su capacidad inmunomoduladora y a cambios de pH generados por la producción de ácido láctico. Por esta razón, este trabajo se enfocó en evaluar la producción del microorganismo y del ácido láctico, adaptando como sustrato un subproducto de la industria láctea (lactosuero), que es un gran contaminante al verterlo a los cuerpos de agua, para esta investigación el lactosuero es desproteínizado y enriquecido con diferentes cantidades de glucosa. Se lograron estandarizar curvas de crecimiento bacteriano en lactosuero con una producción celular de  $5,9 \times 10^{10}$  UFC/ml en 75 h, y de ácido láctico de 70,39 y 76,24 g/l en 93 h, con 0% y 5% de glucosa respectivamente. Igualmente se estandarizó un proceso de liofilización para conservar el *Lactobacillus casei* producido durante la investigación.

En este mismo orden de ideas, Alejandra *et al*; (2009) estudiaron la composición química y enriquecimiento del lactosuero de leche de caprino para la producción de ácido láctico con *Lactobacillus helveticus*, en el cual se caracterizó el suero, y se evaluó la pertinencia de la cepa *Lactobacillus helveticus* (LH) para la

producción de ácido láctico a partir de lactosuero de leche de caprino enriquecido con tres nutrientes; variables que se estudiaron siguiendo un diseño greco latino.

Para tal efecto, se llevaron a cabo 16 cinéticas en un biofermentador intermitente conteniendo 250 mililitros de lactosuero de leche de caprino en donde la mayor producción de ácido láctico 17,72 gramos por litro se logra después de las 50 horas para el medio que contiene extracto de levadura 2,5 %, riboflavina 0,6 % y sulfato de amonio 0,45 % operando el biofermentador a 42 °C. Se concluyó que además de producir ácido láctico, el *Lactobacillus helveticus* es una alternativa para evitar la contaminación de ecosistemas puesto que generaría un valor agregado a la agroindustria quesera.

Finalmente Suárez, (2009) evaluó y simuló la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Debido a la gran cantidad de oportunidades que existen en el mercado para este compuesto, la producción del ácido láctico se evaluó por medio de procesos de biotransformación con *Lactobacillus casei* ATCC 7469 bajo diferentes concentraciones de carbonato de calcio como agente regulador del pH, así como el modo de operación batch y fed-batch por pulsos en un biorreactor de 3 Litros.

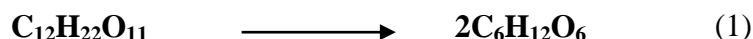
Adicionalmente, se ajustó la cinética de crecimiento de biomasa a la ecuación logística, la cinética de producción de ácido láctico a la ecuación de Luedeking–Piret, y la cinética de consumo de sustrato a la propuesta por Islam *et al.*, (2003). Se encontró que la concentración de carbonato de calcio no tuvo efecto significativo sobre la producción de ácido láctico ( $P > 0.05$ ), y que no habían diferencias significativas entre el modo batch y fed-batch.

Como síntesis, todas las investigaciones científicas mencionadas anteriormente tuvieron como objetivo al igual que este trabajo, el estudio de parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*, los cuales aportaron datos de relevante importancia para la investigación y caracterización de dicho proceso basado en tres variables importantes como concentración de biomasa, sustrato y formación de producto.

## 5.2 BASES TEÓRICAS

### 5.2.1 Fermentación Láctica

Casi todos los microorganismos producen una cierta cantidad de ácido láctico de la escisión de los hidratos de carbono, y se acaba de indicar que también es uno de los productos de la fermentación alcohólica, aunque en pequeña cantidad. El ácido láctico es, por tanto el producto principal de la fermentación láctica, en algunos casos es el único producto final (homofermentación) y en otras ocasiones se produce además lactato, etanol y eventualmente acetato (heterofermentación). La ruta metabólica de la fermentación láctica comienza con la glucosa, para que se inicie a partir de la lactosa es necesario que se produzca una escisión hidrolítica de la misma, por acción de una enzima: lactasa



Mientras que la fermentación homoláctica es la interesante para la industria agroalimentaria, es útil para la fabricación de muchos productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, la fermentación heteroláctica en cambio, representa una de las causas más frecuente de la aparición de malos sabores en esos mismos productos y es también la causante de la alteración conocida como picado láctico en los vinos. La fermentación heteroláctica se utiliza en la producción de bebidas ácido alcohólicas a base de leche, como el Kéfir.

### 5.2.2 Producción biotecnológica de ácido láctico

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blonodeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littlelon inicia la fermentación a escala industrial. Es un compuesto muy versátil utilizado en la industria química, farmacéutica, de alimentos y de plásticos.

Existen dos isómeros ópticos, el D (-), láctico y el L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D (-) y L (+). A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano. Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición.



Tabla 3. Propiedades del ácido láctico

Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	L(+) y D(-) 52,8 a 54 °C
Punto de ebullición	125-140 °C
Gravedad específica	1.206
Calor de combustión	3.616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm <sup>-2</sup>
Densidad	1,249 g/ml
Constante dieléctrica	22ε

Fuente: Panesar *et al.*, (2007).

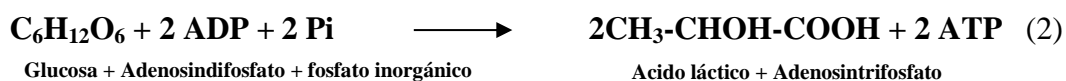
### 5.2.3 Producción industrial

El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica. La producción química, está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico; otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador.

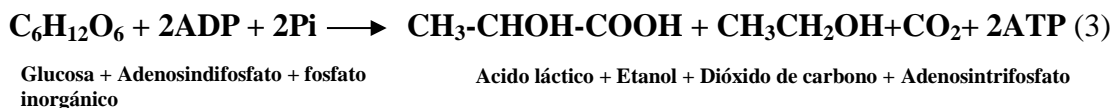
La síntesis química tiene la desventaja que el ácido láctico producido es una mezcla de D y L ácido láctico óptimamente inactivo, por lo cual el 90% del ácido láctico producido en el mundo es elaborado por vía biotecnológica. La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos.

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostc*, *Tetragenococcus*. Las bacterias del ácido láctico (LAB) tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. La mayoría de LAB producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico.

Las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, producen únicamente isómeros L, mientras las especies del género *Leuconostc* producen únicamente isómeros D. Sin embargo, algunas LAB producen formas racémicas donde el isómero predominante depende de cambios en la aireación, cantidad de NaCl, tipo de fermentación, incrementos en el pH y concentración de sustrato. Acorde con los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono las LAB se dividen en homofermentativas y heterofermentativas. En el metabolismo homofermentativo, se produce predominantemente ácido láctico y las bacterias usan la hexosa. Algunas de las bacterias que tienen este metabolismo son *delbruekii*, *helveticus*, etc. La estequiometría clásica de la fermentación homoláctica es la siguiente:



En la fermentación heteroláctica hay formación de xilulosa-5 fosfato por el sistema de la glucosa-6 fosfato deshidrogenada. La estequiometria heteroláctica a partir de glucosa es la siguiente:



El ácido láctico además puede ser producido en mayor o menor proporción por bacterias que no suelen incluirse en el grupo láctico, tal es el caso de *Bifidobacterium*, algunas especies de *Bacillus*, *Clostridium*. De las LAB, *Lactobacillus delbrueckii* es el microorganismo más utilizado en la producción a gran escala de ácido láctico, ya que tiene la ventaja de producir únicamente isómeros L (+), consumir eficientemente glucosa y ser un microorganismo termófilo con temperatura óptima de crecimiento 41.5°C, lo que reduce costes de enfriamiento y esterilización, así como riesgos de contaminación microbiológica en el fermentador. Este microorganismo crece bien a un pH entre 5,5 y 6,5 por lo que el ácido producido debe ser continuamente neutralizado. Los hongos utilizados en la producción de ácido láctico son mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces*.

En la producción biotecnológica de ácido láctico con bacterias o con hongos, se utilizan como sustratos, sacarosa proveniente de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera, pero debido a que el azúcar puro es de alto coste se han venido investigando otros sustratos (desechos agrícolas) para disminuir los costes de producción. Sin embargo, la producción de ácido láctico de estas fuentes renovables requiere de los siguientes pasos:

- 1) Hidrólisis del sustrato hasta azúcares fermentables.
- 2) Fermentación de azúcares a ácido láctico.
- 3) Separación de biomasa y partículas sólidas del medio de fermentación.
- 4) Purificación del ácido láctico obtenido.

En la obtención comercial con bacterias lácticas, al sustrato puro se le adiciona una fuente de vitaminas y de cofactores, se utiliza una mezcla de 10 a 15% de glucosa, cantidades menores de fosfato de amonio, extracto de levadura y 10% neutralizante. El medio se inocula y se agita sin aireación para optimizar la neutralización del ácido formado. La fermentación dura entre 2 a 4 días y se termina cuando todo el azúcar es consumido, con el fin de facilitar la purificación. Al final de la fermentación el medio es ajustado a pH 10 y si se utiliza carbonato de calcio, el medio es calentado para solubilizar el lactato de calcio y coagular proteínas presentes.

Posteriormente el medio se filtra para eliminar sustancias insolubles, así como biomasa. El ácido libre se obtiene por adición de ácido sulfúrico seguido de filtración para eliminar el sulfato de calcio formado. El ácido láctico es entonces concentrado por evaporación. Debido a que el tipo de fermentación descrito (en discontinuo) está limitado por el daño que sufren las células por la acumulación en el medio de fermentación de la forma no dissociada del ácido, se han investigado otros modos de fermentación como son la fermentación en discontinuo con alimentación intermitente.

La fermentación en discontinuo con alimentación intermitente es un proceso en cual el biorreactor es alimentado de continua o secuencialmente con sustrato, sin la eliminación del medio de fermentación, mientras que la fermentación en continuo la corriente de producto posee la misma composición que el líquido presente en el reactor.

#### **5.2.4 Usos y especificaciones**

El ácido láctico y sus derivados como sales y ésteres son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, química, farmacéuticas, del plástico, textil, la agricultura, alimentación animal entre otros. En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante. Las industrias químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como solvente biodegradable. En la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico.

### 5.2.5 Definición, composición y tipos de lactosuero

El lactosuero es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegeding y Luck, 2002). Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. El segundo llamado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2003).

En la siguiente tabla se puede detallar la composición nutricional del lactosuero dulce y ácido, observándose que el dulce tiene mayor lactosa y mayor proteína respecto al ácido.

Tabla 4. Composición de lactosuero dulce y ácido.

Composición	Lactosuero dulce (g/l)	Lactosuero ácido (g/l)
Sólidos totales	63,0- 70,0	63,0- 70,0
Lactosa	46,0- 52,0	44-46,0
Proteína	6,0- 10,0	6,8-8,0
Calcio	0,4- 0,6	1,2- 1,6
Fosfatos	1,0- 3,0	2,0- 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Fuente: Panesar *et al.*, (2007).

En cualquiera de los dos tipos de lactosuero obtenidos, se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes. Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5-5% p/v), proteínas solubles

(0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco). Presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico (Londoño, 2008).

Este gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3,5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido (Muñi *et al.*, 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Almeida *et al.*, 2009).

#### **5.2.6 *Lactobacillus casei***

Este género se caracteriza por presentar células varias desde bacilos largos y delgados hasta cortos y curvados (Bergey, 1986); y comprenden especies homofermentativas en su mayor parte, aunque algunas son heterofermentativas. Generalmente se encuentran en productos lácteos y algunas cepas se usan en la preparación de derivados fermentados de la leche. Resistencia mejor las condiciones de acidez que las otras bacterias ácido lácticas.

Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 40 °C. Su tolerancia al ácido varía desde 0,3% hasta 1,9% de acidez titulable (Gómez, 1999). El pH óptimo para su crecimiento se ubica entre 5,5 y 6,2, pudiendo desarrollarse a pH menores de 5,0 (Kandler *et al.*, 1986). El género *Lactobacillus* está distribuido en varios nichos ecológicos a través del tracto gastrointestinal y genital y constituye una fracción importante de la microflora indígena del hombre. Su repartición es afectada por distintos factores medioambientales, entre los que se incluyen el pH, la disponibilidad de oxígeno, los niveles de sustratos específicos, la presencia de secreciones y las interacciones bacterianas. Estos microorganismos son raramente asociados con casos de infección gastrointestinal y extraintestinal, y las cepas empleadas tecnológicamente son consideradas como no patogénicas (Gómez, 1999).

Esta bacteria hace parte de un grupo que consiste de diversas especies de bacterias mesofílicas, ácido lácticas, anaerobias, facultativas y heterofermentativas (Dicks *et al*, 1996), con morfología de bacilo, su metabolismo depende de la cepa. Es una bacteria ácido láctica que se encuentra naturalmente en las leches fermentadas, carnes, vegetales fermentados, boca e intestino humano y en el ambiente. (Collins *et al.*, 1989). Se caracteriza por ser Gram positivo, sin motilidad y no formar esporas, posee un metabolismo estrictamente fermentativo con ácido láctico como producto final (Vega, 2006).

Este microorganismo produce ácido láctico predominante de la forma L(+), no metabolizan el citrato y no es capaz de producir diacetilo; se utiliza en la industria láctea en la elaboración de prebióticos (Arriaga, 2013), y solo se puede utilizar en asociación con otras bacterias ácido lácticas o sólo, para crear diferentes propiedades organolépticas. Es muy resistente a intervalos muy amplios de pH y temperatura y en fermentaciones que implican altas concentraciones de lactosa o glucosa el principal producto formado es ácido láctico mientras que a concentraciones muy bajas de estos azúcares produce otros productos; estas utilizan las hexosas siguiendo la ruta glucolítica de Embden- Meyerhof además dichas bacterias tienen una excepción importante en el metabolismo de la galactosa la cual es metabolizada a través de la ruta de la glucosa 6- fosfato (Arriaga, 2013).

Hoy en día existe un creciente interés de optimización y maximización en la producción biotecnológica de ácido láctico a partir de *Lactobacillus casei*., debido a su estabilidad en condiciones de trabajo a escala industrial y resistencia a determinados valores de temperatura y pH (Bonilla, 2013). En forma taxonómica, *L. casei*, es reconocida como un grupo de varias especies, dado a que ellas son genéticamente similares, diferenciándose en ciertas características como son, temperatura óptima de crecimiento y habilidad para fermentar distintos tipos de carbohidratos. El *Lactobacillus casei* tiene forma de bastón con un rango de tamaño entre 0.7-1.1 x 2.0-4.0 µm, tolerantes a medios ácidos, incapaces de sintetizar porfirinas y su producto metabólico principal es el ácido láctico. El *Lactobacillus casei* puede crecer entre 15 y 45 °C y requiere riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y factores de crecimiento de niacina. (Kandler y Weiss, 1986).

### **5.2.6 Requerimientos nutricionales y micronutrientes para *Lactobacillus casei***

Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de Carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos.

Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS (Man Rogosa y Sharpe). Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de crecimiento especiales.

### **5.2.7 Micronutrientes**

Como su nombre lo dice los micronutrientes se requieren en pequeñas cantidades, sin embargo son de suma importancia en el crecimiento celular, además que, funcionan como cofactores y sirven de estructura para varias enzimas. Por ejemplo, el manganeso, es un cofactor de crecimiento esencial para el *Lactobacillus casei* debido a su función como constituyente de la enzima lactosa deshidrogenasa por consiguiente debe ser añadido al medio de cultivo en forma de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Esto es necesario junto con la suplementación de extracto de levadura para mejorar la productividad de ácido láctico y el consumo de lactosa.

### **5.2.8 Factores que afectan el crecimiento de *Lactobacillus casei* y la eficiencia de producción de ácido láctico**

La efectividad del proceso biotecnológico de producción de ácido láctico puede ser medida como la concentración de ácido láctico producido, el rendimiento de ácido láctico basado en el sustrato consumido y como la velocidad de producción del ácido láctico. Esto depende de varios factores que pueden afectar el crecimiento del *Lactobacillus casei* en el medio de fermentación, algunos de estos son: la fuente



de carbono y nitrógeno, el tipo de fermentación, el pH, la temperatura, la formación de subproductos, entre otros.

### 5.2.9 Fuente, aislamiento y conservación del microorganismo

El *Lactobacillus casei* Actualmente se dispone de muchos medios de cultivos para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas aunque algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos; la capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas y bioproductos. Para análisis, cultivo, conservación y aislamiento microbiológicos del microorganismo generalmente se utilizan los siguientes procedimientos tales como:

Recuento en agar MRS (Man Rogosa y Sharpe).

Recuento en agar M17

Tinción de Gram

Prueba de la Catalasa

Prueba de la Oxidasa

Liofilización

Conservación en nitrógeno líquido

Aislamiento del *Lactobacillus casei* proveniente de leches fermentadas

Para la identificación se cuenta con las siguientes alternativas:

**Catalasa:** se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno (Villanueva, 2007).

**Oxidasa:** prueba que sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

**Tinción de Gram:** coloración que permite la clasificación de las bacterias en Gram positiva y Gram negativa según la composición de su pared celular.

Para la conservación de las bacterias lácticas existen una gran variedad de métodos de mantenimiento y conservación cuya utilización va a depender en parte del tiempo previsto; entre estas podemos encontrar:

**Liofilización:** consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismo y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por estado intermedio líquido (Alvarez, 2004).

**Conservación en nitrógeno líquido (-196°C):** la actividad metabólica de los microorganismos puede ser reducida considerablemente almacenándolos en temperaturas muy bajas lo cual puede lograr utilizando nitrógeno líquido. Este es el método más adecuado para la mayoría de las células (Alvarez, 2004).

#### **5.2.10 Aislamiento del *Lactobacillus casei* proveniente de leches fermentadas**

La leche fermentada se deja fermentar alrededor de 25 días antes de iniciar el aislamiento. Estas células se aíslan en agar selectivo MRS (Man Rogosa y Sharpe) y se incuban en condiciones anaeróbicas durante 48 horas a 37°C. Las colonias aisladas en el medio MRS se caracterizan morfológicamente por medio de la coloración Gram y pruebas bioquímicas convencionales como reducción de azúcares y catalasa, las colonias que no se ajustan a estos parámetros son descartadas. Luego de esta etapa se escoge algunas de las técnicas de conservación de microorganismos más apropiada

El agar MRS (Man Rogosa y Sharpe) fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido láctico, compuesto principalmente de:

Tabla N° 5. Composición química del agar MRS

Formula	g/l
Proteasa peptona N° 3	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Monoleato desorbitan	1,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de Magnesio	0,2
Manganeso	0,05
Agar	13,0
pH final	6.4 ± 0,2

Fuente: Britania, (2010)

### 5.2.11 Cinética de crecimiento

La microbiología comprende el estudio de una amplia variedad de sistemas vivientes inferiores que incluyen virus, bacterias, algas, hongos simples como las levaduras y mohos; su crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual para organismos unicelulares conduce a un aumento en el número de individuos en la población.

Desde un punto de vista matemático existe poca diferencia entre las ecuaciones cinéticas para enzimas y células, después de todo, el metabolismo celular depende de la acción integrada de multitud de enzimas.

#### **5.2.12 Crecimiento en un cultivo discontinuo**

En un cultivo discontinuo se observan varias fases de crecimiento celular, las cuales se describen a continuación:

##### **Fases de crecimiento**

- 1. Fase lag:** o fase de adaptación: el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. Cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo del crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Los cambios de las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH también pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo.
- 2. Fase de aceleramiento:** en esta fase, diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el RNA (por sus iniciales en inglés ácido ribonucleico), seguido de las proteínas y del peso individual. La concentración celular es generalmente la última que muestra este incremento.
- 3. Fase exponencial:** durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente, aunque en general no se alcanzan valores muy elevados.
- 4. Fase de desaceleración:** en esta fase se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo cual las condiciones de cultivo son sub-óptimas. En consecuencia, la tasa de división celular disminuye aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor. En este periodo la composición bioquímica de la biomasa cambia de manera opuesta a la mencionada para la fase de aceleración.

- 5. Fase estacionaria:** durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (**efecto de autosombreado**). Otro factor que puede limitar el crecimiento es la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo.
- 6. Fase de muerte:** la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Además se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular. En una curva de crecimiento como la que se presenta en la Figura 2 se pueden reconocer las diferentes fases (Vonshak y Maske, 1982), las cuales se definen a continuación:

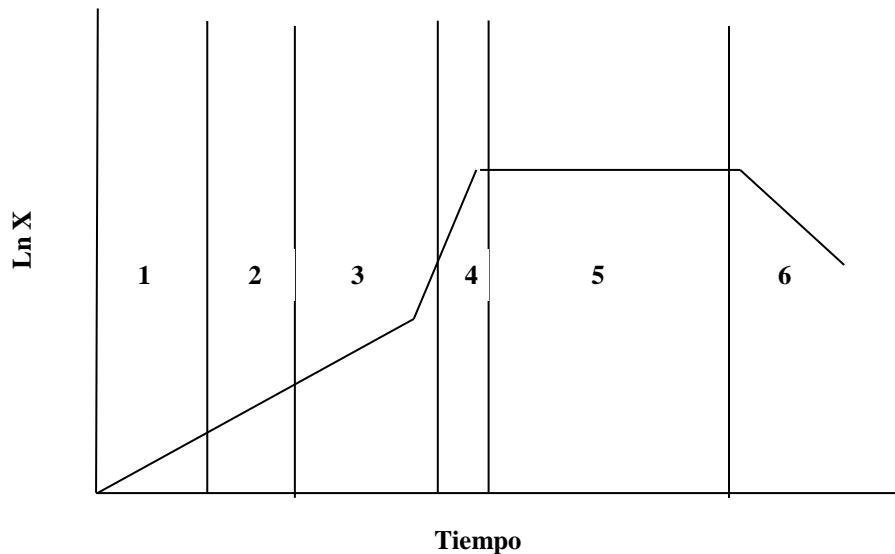


Figura 1. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases, marcadas como: 1 fase lag; 2 fase de aceleramiento; 3 fase exponencial; 4 fase de desaceleración del crecimiento; 5 fase estacionaria; 6 fase de muerte.

### **5.2.13 Efecto de la concentración de sustrato**

La velocidad específica de crecimiento de las células durante las fases de crecimiento y desaceleración de un cultivo discontinuo, depende de la concentración de nutrientes existente en el medio. A menudo un único sustrato ejerce un efecto dominante sobre la velocidad de crecimiento. Este componente es lo que se denomina como sustrato limitante de la velocidad de crecimiento o simplemente sustrato limitante del crecimiento. El sustrato limitante del crecimiento es a menudo la fuente de carbono o de nitrógeno aunque en algunos casos es el oxígeno u otro oxidante como los nitratos.

### **5.2.14 Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de crecimiento**

El crecimiento de los microorganismos durante el cultivo en lote y el continuo puede ser cuantificado gracias a los estudios realizados por J. Monod en 1950. Él fue el primero en estudiar el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Hernández, 2003).

### **5.2.15 Cinética de crecimiento celular (Ecuación de Monod)**

También conocido como modelo de crecimiento celular, describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la concentración del nutrimento limitante (S) en un cultivo microbiano, se representa por la siguiente expresión matemática:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \times \frac{S}{(K_s + S)} \quad (4)$$

#### **5.2.15.1 Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

Es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en  $h^{-1}$ . Se mantiene constante durante la fase logarítmica, y en la curva de crecimiento, se representa por la pendiente de la línea que simboliza la fase logarítmica.

#### **5.2.15.2 Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ )**

Es la velocidad máxima de multiplicación que puede alcanzar el microorganismo, en las condiciones en la que está creciendo. Esta velocidad es igual a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) cuando el microorganismo está en fase logarítmica.

#### **5.2.15.3 La constante específica de cada sustrato ( $K_s$ )**

Es la constante de utilización del sustrato limitante y representa la afinidad de los organismos por ese sustrato. La constante  $K_s$  es la concentración de sustrato a la que se producen microorganismo con una velocidad igual a la mitad de la velocidad específica máxima de crecimiento. Si el organismo tiene gran afinidad por el sustrato limitante, el valor de  $K_s$  es bajo. Los valores de  $K_s$  de diferentes sustratos oscilan en un intervalo entre  $1,1 \times 10^{-3}$  y 25 mg/l para varios de los microorganismos.

#### **5.2.15.4 Sustrato limitante (S)**

Es el sustrato que debido a su concentración (g/l), va a hacer el que restrinja el crecimiento de los microorganismos. Puede ser la fuente de carbono y energía.

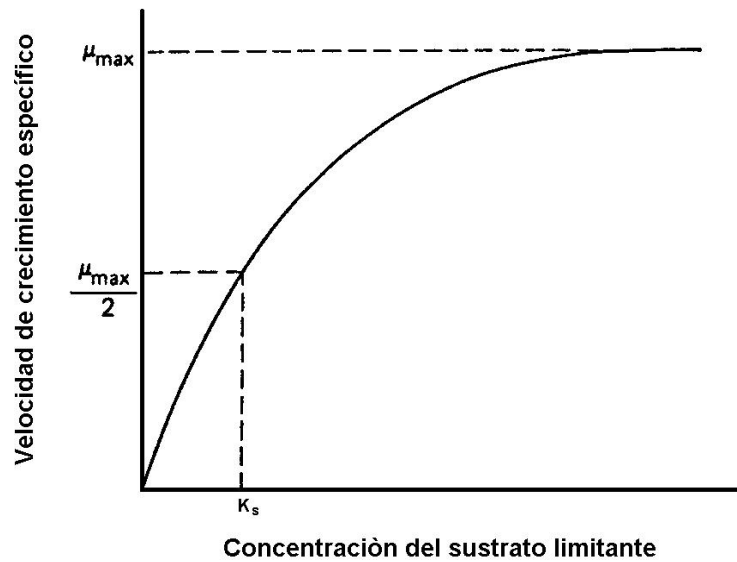


Figura 2. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según la ecuación de Monod.

Fuente: Hernández, (2003).

#### 5.2.16 Cinética del consumo de sustrato:

El sustrato consumido por el microorganismo tiene como finalidad el crecimiento celular, mantenimiento de las actividades vitales y la generación de producto, para el caso donde la formación de producto no esté asociada de forma directa al metabolismo energético.

La ecuación cinética global será:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_X \frac{S}{S}} \frac{dx}{dt} - \frac{1}{Y_P \frac{S}{S}} \frac{dP}{dt} - mSx \quad (5)$$



Dónde:

S: Concentración de sustrato (g/l).

t: Tiempo (h).

$Y_{x/s}$ : Rendimiento del crecimiento celular con respecto al consumo de sustrato

$Y_{p/s}$ : Rendimiento de formación de producto con respecto al consumo de sustrato.

P: Concentración de producto (ácido láctico) (g/l).

x: Biomasa (g/l).

m: Coeficiente de mantenimiento celular ( $h^{-1}$ ).

#### 5.2.17 Cinética de formación de producto:

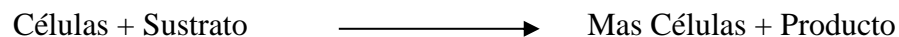
De manera análoga al modelo cinético de consumo de sustrato se plantean diferentes ecuaciones para modelar la formación de producto.

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (6)$$

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{X/S} \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

#### Cinética y balance principales para un biorreactor

Según Fogler (2001), aunque existen muchas leyes para la velocidad de crecimiento de células nuevas, es decir,



La expresión que se usa más comúnmente es la ecuación de Monod para el crecimiento exponencial:

$$r_g = \mu \cdot C_C \quad (8)$$

Dónde:

$r_g$  = Velocidad de crecimiento celular

$C_C$  = Concentración de células, g/dm<sup>3</sup>

$\mu$  = Velocidad de crecimiento específica

La velocidad de crecimiento específica se puede expresar como:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (8)$$

Dónde:

$\mu_{\max}$  = Velocidad de reacción de crecimiento específica máxima

$C_S$  = Concentración de sustrato, g/dm<sup>3</sup>

$K_S$  = Constante de Monod, g/dm<sup>3</sup>

$K_S$  es pequeña para varias especies de bacterias y, en ese caso, la ley de velocidad se reduce a:

$$r_g = \mu_{\max} \cdot C_C \quad (9)$$

La velocidad de crecimiento,  $r_g$ , a menudo depende de la concentración de más de un nutriente; sin embargo, el nutrimento que suele usarse en la ecuación ( ) es el nutrimento limitante. Si combinando ambas ecuaciones ( ) y ( ) obtenemos:

$$r_g = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot C_c \quad (10)$$

En muchos sistemas, el producto inhibe la velocidad de crecimiento. Un ejemplo clásico de esta inhibición se observa en la producción de vino, donde la fermentación de la glucosa para producir etanol, es inhibida por este producto. Hay varias ecuaciones distintas que toman en cuenta esta inhibición; una de esas leyes de velocidad adopta la forma:

$$r_g = K_{OBS} \cdot \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S} \cdot C_c \quad (11)$$

Dónde:

$$K_{OBS} = \left(1 - \frac{C_p}{C_{p*}}\right)^n \quad (12)$$

$C_{p*}$  = Concentración del producto en la que cesa todo el metabolismo, g/dm<sup>3</sup>

$n$  = Constante empírica

En el caso de la glucosa a etanol, los parámetros de inhibición típicos son:

$n = 0,5$  y  $C_{p*} = 93$  g/dm<sup>3</sup>

### Estequiometria

Según Fogler (2001), la estequiometria del crecimiento celular es muy compleja y varía con el sistema microorganismo/ nutrientes y las condiciones del entorno como pH, temperatura y potencial redox. Esta complejidad se incrementa considerablemente cuando más de un nutriente contribuye con el crecimiento celular, como suele suceder.

En general, se cumple:

Células + Sustrato  $\longrightarrow$  Mas Células + Productos

Sustrato  $\longrightarrow$   $Y_{c/s} \cdot C$  +  $Y_{p/s} \cdot P$

Donde los coeficientes de rendimientos son:

$$Y_{C/S} = \frac{\text{Masa de células nuevas formadas}}{\text{Masa de sustrato consumida para producir células nuevas}} \quad (13)$$

Con:

$$Y_{c/s} = \frac{1}{Y_{S/C}} \quad (14)$$

El coeficiente de rendimiento estequiométricos que relaciona la cantidad de producto formada con masa de sustrato consumida es:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Masa de producto formado}}{\text{Masa de sustrato consumida para formar producto}} \quad (15)$$

Además del sustrato que se consume para producir células nuevas, parte de este debe utilizarse para mantener las actividades diarias de la célula. El término correspondiente para el consumo para mantenimiento es:

$$m = \frac{\text{Masa de sustrato consumida para mantenimiento}}{\text{Masa de células.tiempo}} \quad (16)$$

Un valor típico es:

$$0,05 \frac{\text{g de sustrato}}{\text{peso seco(g)}} = \frac{1}{h} = 0,05 \text{ h}^{-1}$$

La rapidez de consume de sustrato para mantenimiento, sea que las células estén creciendo o no, es:

$$r_{sm} = m \cdot C_C \quad (17)$$

El coeficiente de rendimiento  $Y_{c/s}$ , da cuenta del consumo de sustrato para mantenimiento :

$$Y_{c/s} = \frac{\text{Masa de células nuevas formadas}}{\text{Masa de sustrato consumida}} \quad (18)$$

La formación de producto puede ocurrir durante diferentes fases del crecimiento celular. Cuando el producto solo se genera durante la fase de crecimiento, se puede escribir:

$$r_p = Y_{p/c} \cdot r_g \quad (19)$$

Por otra parte, cuando se genera producto durante la fase estacionaria, podemos relacionar la formación de producto con el consumo de sustrato así:

$$r_p = Y_{p/s} \cdot (-r_s) \quad (20)$$

En general, se puede escribir:

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad neta} \\ \text{de consumo de} \\ \text{sustrato} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de consumo} \\ \text{por las células} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de consumo para} \\ \text{formar producto} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{de consumo} \\ \text{para mantenimiento} \end{array} \right]$$

$$-r_s = Y_{s/c} \cdot r_g + Y_{s/p} \cdot r_p + m \cdot C_c \quad (21)$$

En varios casos se debe prestar atención especial al balance de sustrato. Si el producto se forma durante la fase de crecimiento, podría ser imposible distinguir la cantidad de sustrato que se consume para crecimiento de la que se consume para formar el producto. En estas circunstancias todo el sustrato consumido se incorpora en el coeficiente estequiométrico,  $Y_{s/c}$ , y la velocidad de desaparición del sustrato es:

$$r_s = Y_{s/c} \cdot r_g + m \cdot C_c \quad (22)$$

La velocidad de formación de producto correspondiente es

$$r_p = r_g \cdot Y_{p/c} \quad (23)$$

Puesto que no hay crecimiento en la fase estacionaria, es evidente que no se puede usar la ecuación 21 para determinar el consumo de sustrato, ni tampoco relacionar la velocidad de formación de producto con la tasa de crecimiento (por ejemplo la ecuación 22). Muchos antibióticos, como la penicilina, se producen en la fase estacionaria. En esta fase, el nutriente que se consume para el crecimiento prácticamente se ha agotado y se usa un nutriente distinto, llamado nutriente secundario, para el mantenimiento celular y la formación de producto deseado. Por lo regular, la ley de velocidad para la formación de producto durante la fase estacionaria tiene una forma similar a la ecuación de Monod, es decir:

$$r_p = \frac{K_p \cdot C_{sn} \cdot C_c}{K_{sn} + C_{sn}} \quad (24)$$

Dónde:

$C_{sn}$  = Concentración del nutriente secundario, g/dm<sup>3</sup>

$K_p$  = Constante de velocidad específica con producto, s<sup>-1</sup>

$C_c$  = Concentración de células, g/dm<sup>3</sup>

La velocidad neta de consumo del sustrato durante la fase estacionaria es:

$$-r_{sm} = m \cdot C_c + Y_{sn/p} \cdot r_p \quad (25)$$

$$-r_{sm} = m \cdot C_c + Y_{sn/p} \cdot \frac{K_p \cdot C_{sn} \cdot C_c}{K_{sn} + C_{sn}} \quad (26)$$

Dado que se puede formar el producto deseado cuando no hay crecimiento celular, siempre es mejor relacionar la concentración del producto con el cambio en la concentración del sustrato. En el caso de un sistema por lotes, la concentración del producto,  $C_p$ , formado después de un tiempo,  $t$ , se puede relacionar con la concentración del sustrato,  $C_s$ , en ese instante:

$$C_p = Y_{p/s} \cdot (C_{s0} - C_s) \quad (27)$$

Se ha considerado dos situaciones limitantes para relacionar el consumo de sustrato con el crecimiento celular y la formación de producto; formación de producto solo durante la fase de crecimiento y formación de producto solo durante la fase estacionaria. Un ejemplo en el que no aplica ninguna de estas dos situaciones es la fermentación con lactobacilos, donde se produce ácido láctico durante la fase de crecimiento logarítmico como durante la fase estacionaria.

## **VI METODOLOGÍA**

### **6.1 Diseño de la investigación**

La presente investigación posee un enfoque cuantitativo, del tipo experimental según Tamayo (2001), la define como aquella investigación en la cual el investigador maneja de manera deliberada la variable experimental y luego observa lo que ocurre en condiciones controladas. En la presente investigación se evaluaron los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*. El medio empleado en las fermentaciones fue el siguiente: suero entero y desproteinizado, ambos sometidos y enriquecidos a cuatro niveles de concentración de lactosa 0, 1, 5 y 10 % p/v. Considerando que la concentración de inóculo, la temperatura y el pH se mantuvieron constantes en cada uno de los tratamientos. Cabe destacar, que el nivel cero (0) de concentración se refiere a la concentración de lactosa nativa del lactosuero antes de la suplementación.

### **6.2 Localización**

El plan experimental, se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Fundación CIEPE, ubicada en la zona Industrial “Agustín Rivero” así como en el laboratorio de Análisis instrumental y Microbiología de la Universidad Politécnica Territorial de Yaracuy “Arístides Bastidas” ambos localizados en el Municipio Independencia del estado Yaracuy, Venezuela

Las etapas a través de las cuales se llevó a cabo la investigación , se describen a continuación:



## **6.3 Materiales**

### **6.3.1 Población y muestra**

#### **6.3.1.1 Caracterización del lactosuero (Medio de cultivo)**

El lactosuero, se obtuvo de la última etapa de producción de quesos de la empresa Lácteos La Fe. C.A ubicada en San Felipe, estado Yaracuy. Se tomó una muestra de 36 litros la cual se caracterizó midiendo humedad, sólidos totales, sólidos solubles (°Brix), cenizas, proteínas y lactosa.

## **6.4 Activación del microorganismo y mantenimiento del cultivo**

Cepas liofilizadas de *Lactobacillus casei*, fueron activadas en 10 ml de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) incubando a 37°C durante 24 h, periodo después del cual se tomó 1 ml y se agregaron a 9 ml de caldo MRS y posterior incubación a 37°C durante 6 h. Del caldo se tomó 1 ml y se realizaron siembras en profundidad en Agar MRS y se incubó a 37°C durante 48 h.

## **6.5 Adaptación del microorganismo**

Se adaptó inoculando con 10 ml de *Lactobacillus casei* activado en 500 ml de lactosuero e incubando a 37°C durante 12 h.

## **6.6 Pretratamiento de lactosueros**

El lactosuero se sometió a desproteinización por tratamiento térmico esterilizando en autoclave a una presión de 0,1 MPa y temperatura de 120 °C y un tiempo de 15 min, posteriormente se enfrió a 20 °C para finalmente someterlo a filtrado, centrifugado y filtrado a vacío con papel Whatman número 42.

El lactosuero entero fue sometido a pasteurización a 90°C por un tiempo de 20 minutos. Ambos lactosueros fueron caracterizados antes midiendo acidez titulable, sólidos solubles, contenido de lactosa, proteína, humedad y cenizas. Posteriormente, se preparó un cultivo de adaptación (Preinóculo) para cada lactosuero. No se suplementaron los lactosueros, debido a que solo se pretendía conocer su capacidad como sustrato únicamente con su composición usual (Alvarez y Aguirre, 2008). Finalmente, se realizaron mediciones de pH, acidez y recuento de microorganismos, en intervalos de una hora para confirmar las condiciones óptimas para ser inoculado.

## **6.7 Proceso de fermentación**

Con el fin de establecer las mejores condiciones para la producción de ácido láctico por las bacterias, la fermentación se llevo a cabo en 8 montajes diseñados en fiolas de 500 ml bajo condiciones anaeróbicas. Se realizaron 4 repeticiones por cada tratamiento, controlándose la temperatura a 37°C, pH entre 5 y 5,6, concentración de inóculo (10 %).

Las muestras de lactosuero (entero y desproteínizado) fueron enriquecidas con lactosa a niveles 0, 1, 5 y 10% (p/v) para un total de 4 niveles de concentración, bajo condiciones asépticas. Para el control, se sometieron ambos lactosueros a las mismas condiciones de fermentación.

## **6.8 Seguimiento de la fermentación**

Se realizaron 8 montajes (4 repeticiones por cada uno), obteniéndose un total de 32 observaciones (unidades experimentales) para llevar a cabo el proceso de fermentación láctica a partir del lactosuero previamente adaptado y acondicionado.

A cada unidad experimental se analizó lo siguiente:

Formación de producto (ácido láctico), consumo de sustrato (lactosa) y producción de biomasa (Peso seco). Adicionalmente se determinó los sólidos solubles (°Brix). Estos análisis se realizaron por duplicado a tiempos dados desde el tiempo cero que corresponde a la inoculación, hasta que termina cada fermentación. Se realizaron mediciones en intervalos de tiempo comprendidos en 0, 24, 48 y 72 horas.

#### **6.8.1 Consumo de sustrato**

Para establecer el comportamiento en relación al consumo de sustrato (Lactosa), se tomó como base la curva patrón de azúcares reductores (Anexo D), determinada por el método colorimétrico modificado DNS (ácido dinitrosalicílico). La concentración de lactosa presente en el medio de cultivo, fue medida por el método espectrofotométrico a 540 nm (AOAC 16051; Serna y Naranjo 2005; Serna y Rodríguez 2007).

#### **6.8.2 Biomasa.**

Se determinó a través de la determinación de peso seco empleando el método de secado por estufa a una temperatura de 105 °C.

#### **6.8.3 Acidez desarrollada.**

Fue medida mediante titulación (como acidez titulable) según norma COVENIN 658:1997.

#### **6.8.4 Contenido de nitrógeno y proteína**

Determinación de proteína (Kjeldahl) por el método de la AOAC 991.20.

### **6.8.5 Contenido de humedad**

Se determinó por el método según COVENIN 932:1997

### **6.8.6 Densidad**

Se determinó por el método según COVENIN 367:82

### **6.8.7 Contenido de Sólidos totales**

Se determinó por el método de estufa modificado (AOAC 925.105/90 adaptado)

## **6.9 Estimación de parámetros cinéticos**

Se calcularon los parámetros cinéticos: Rendimiento del producto a partir del sustrato ( $Y_{p/s}$ ), rendimiento del producto con respecto a la biomasa ( $Y_{p/x}$ ), rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y productividad volumétrica ( $Q$ )

### **6.9.1 Rendimiento observado de sustrato en producto ( $Y_{p/s}$ )**

El cálculo del rendimiento de sustrato en producto se define como los gramos de ácido láctico producidos sobre los gramos de lactosa consumida, por esto el cálculo de este parámetro está definido por la ecuación 28:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Gramos de ácido láctico producidos}}{\text{Gramos de lactosa consumida}} \quad (28)$$

El rendimiento teórico de sustrato en producto está definido como los gramos de ácido láctico producidos sobre los gramos de lactosa consumida para la producción de este ácido, por lo tanto, ya que esta es solo una fracción de la lactosa total consumida, el rendimiento teórico es mayor que el rendimiento observado.

### 6.9.2 Productividad Volumétrica (Q)

La productividad volumétrica está definida como los gramos de ácido láctico producidos por unidad de volumen, en un tiempo dado (ecuación 29)

$$Q = \frac{\text{Gramos de ácido lactico producidos}}{\text{Volumen.tiempo}} = \text{g/l.h} \quad (29)$$

### 6.9.3 Rendimiento observado de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s}$ )

El rendimiento observado de sustrato en biomasa está definido como los gramos de biomasa obtenida sobre los gramos de lactosa consumida y se calcula con la ecuación 30:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Gramos de biomasa observada}}{\text{Gramos de lactosa consumida}} \quad (30)$$

## 6.10 Procesamiento y análisis

Las pruebas y los análisis aplicados fueron los de varianza ANAVAR. Se realizaron análisis por cada tiempo. Como prueba de validación se aplicó Shapiro-Wilk y ajuste de los datos por transformación de Johnson (Anexos E, F y G). Los parámetros cinéticos fueron evaluados mediante comportamientos gráficos a los diferentes tratamientos en función del tiempo transcurrido las 72 horas del proceso de fermentación., para lo cual se empleó el software MINITAB 18.

## 6.11 Diseño Estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo 2x4 con sus factores a dos niveles (lactosuero entero y desproteinizado) y a cuatro niveles de concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%), con cuatro repeticiones, para un total de 32 unidades experimentales, evaluando, el consumo de

lactosa, producción de ácido láctico, producción de biomasa y los parámetros cinéticos a las 72 horas de fermentación.

## 6.12 Elaboración de las formulaciones (Tratamientos)

En la siguiente tabla, se muestra los tratamientos que se realizaron.

Tabla 6. Tratamiento estadístico (Arreglo factorial 2x4) de la evaluación de los parámetros cinéticos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *Lactobacillus casei*

Lactosuero	Concentración de lactosa	Combinaciones	Repeticiones
Lactosuero entero (A <sup>0</sup> )	C <sup>0</sup>	A <sup>0</sup> x C <sup>0</sup>	4
	C <sup>1</sup>	A <sup>0</sup> x C <sup>1</sup>	4
	C <sup>2</sup>	A <sup>0</sup> x C <sup>2</sup>	4
	C <sup>3</sup>	A <sup>0</sup> x C <sup>3</sup>	4
Lactosuero desproteinizado (B <sup>0</sup> )	C <sup>0</sup>	B <sup>0</sup> x C <sup>0</sup>	4
	C <sup>1</sup>	B <sup>0</sup> x C <sup>1</sup>	4
	C <sup>2</sup>	B <sup>0</sup> x C <sup>2</sup>	4
	C <sup>3</sup>	B <sup>0</sup> x C <sup>3</sup>	4
Total Unidades experimentales			32

## VII RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1. CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO

La tabla 7 muestra las características fisicoquímicas de los tipos de lactosuero empleados en la investigación.

Tabla N° 7. Resultados de la caracterización fisicoquímica de los lactosueros

Parámetros	Suero entero		Suero desproteinizado	
	X ± S		X ± S	
% Solidos totales	2,54	0,0060	2,44	0,0083
% Humedad	97,46	0,1800	97,56	0,2300
°Brix	2,5	0,0070	2,0	0,0080
pH	5,65	0,0015	5,56	0,0025
Densidad(g/ml)	1,030	0,0012	1,030	0,0090
% Nitrógeno	0,30	0,0045	0,15	0,0050
% Proteínas	1,40	0,0023	0,90	0,0038
Lactosa (g/l)	47,6	0,1120	38,8	0,1120
Calcio( g/l)	0,42	0,0016	0,35	0,0028
Acidez titulable (% ácido láctico)	0,27	0,0062	0,255	0,0053
X: Valor promedio S: desviación estándar				

La caracterización realizada a los lactosueros coincide con el rango de valores reportado para lactosuero ácido y lactosuero de requesón por (Guerrero *et al.*, 2012). Se pudo observar en el suero desproteinizado un ligero incremento en la concentración de la acidez posiblemente causada por el tratamiento térmico al efectuar la desproteinización, al igual que una disminución en el contenido de nitrógeno y lactosa. Los valores de nitrógeno y proteína para este suero son comparables a los hallados por (Urribarri *et al.*, 2009). El valor del pH en los dos tipos de lactosueros, los define como sueros ácidos (Miranda *et al.*, 2009), pudiéndose considerar medianamente ácido al suero entero y

ácido al desproteinizado, de acuerdo a lo observado por (Gutiérrez, 2006); estudios realizados señalan que la mayoría de las bacterias ácido lácticas tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, lo que da la ventaja competitiva sobre otras bacterias (Hofvendahl y Hagerdal, 2000), y al empleo de *Lactobacillus casei* en lactosuero con estas características viable desde el punto de vista biotecnológico para ser usado en producción de ácido láctico. Otras investigaciones reportan que el pH óptimo para la producción de ácido láctico en los lactosueros varía entre 5 y 7 (Vijayakumar *et al.*, 2008).



## 7.2. RELACIÓN DE LA ACIDIFICACIÓN CON EL TIPO DE LACTOSUERO Y CONCENTRACION DE LACTOSA.

Tabla 8. Producción de ácido láctico (g/l), en función del tiempo de fermentación para ambos lactosueros (entero y desproteinizado) empleando *Lactobacillus casei*.

### Tiempo de fermentación (Horas)

Tratamientos	0	24	48	72
LDT	2,55±0,070	4,50±0,040	6,70±0,070	6,50±0,056
LDC1	3,15±0,069	3,50±0,035	9,70±0,075	10,00±0,070
LDC2	2,55±0,072	3,00±0,045	5,60±0,062	5,40±0,040
LDC3	3,15±0,058	3,30±0,030	3,90±0,040	4,05±0,035
LET	2,70±0,065	5,00±0,070	7,50±0,070	6,00±0,056
LEC1	2,25±0,070	5,40±0,067	8,50±0,050	8,30±0,023
LEC2	2,25±0,058	4,10±0,040	4,50±0,023	4,00±0,042
LEC3	2,25±0,080	3,00±0,043	3,50±0,030	3,30±0,027

(Valores promedios ± desviación estándar).

LDT: Lactosuero desproteinizado sin enriquecimiento. LDC1: Lactosuero desproteinizado al 1% p/v, LDC2: Lactosuero desproteinizado al 5% p/v LDC3: Lactosuero desproteinizado al 10% p/v.

LDE: Lactosuero entero sin enriquecimiento. LEC1: Lactosuero entero al 1% p/v, LEC2: Lactosuero entero al 5% p/v LEC3: Lactosuero entero al 10% p/v.

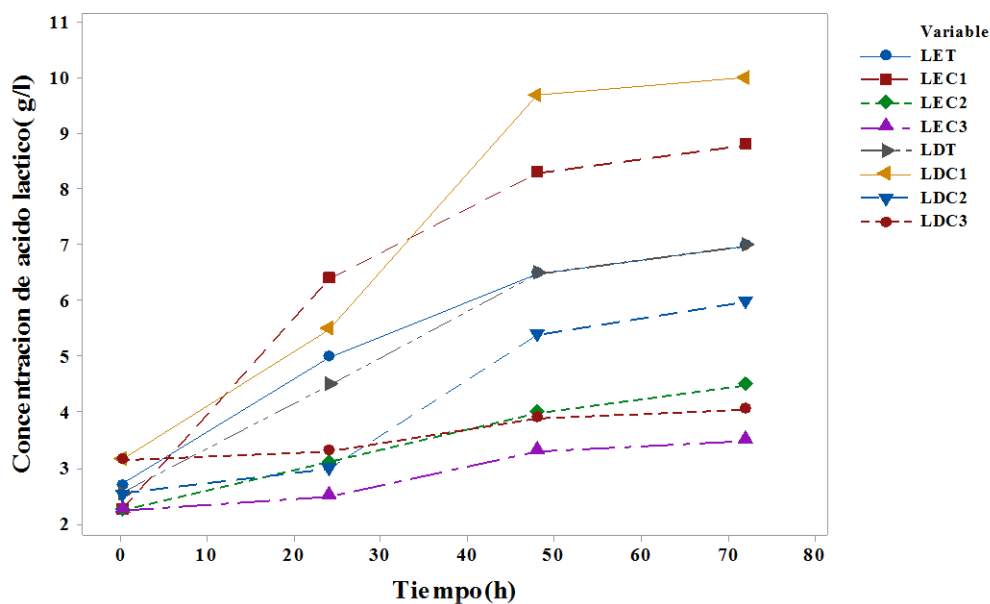


Figura 3. Producción de ácido láctico (g/l) en función del tiempo para lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.

Se observa que el tipo de lactosuero no tiene un efecto significativo con una confiabilidad del 95% ( $p < 0,05$ ) sobre la producción de ácido láctico, debido que no se encontraron según ANAVAR, diferencias estadísticamente significativas ( $F: 0,18 < P: 0,675$ ). No obstante, la concentración de lactosa en el tiempo de fermentación si posee un efecto significativo en cada uno de los tratamientos, sobre la producción de ácido láctico, debido a las diferencias significativas encontradas ( $F: 3,38 > P: 0,035$ ). Por otro lado, la interacción de estas variables no tienen un efecto significativo sobre la formación de ácido láctico ( $F: 0,06 < P: 0,978$ ). (Figura 4).

En los tratamientos con lactosuero desproteinizado se encontraron valores de acidez diferentes en aquellos donde se usó lactosuero entero (Figura 3); tomando en consideración una concentración de inóculo constante del 10%, similares a los valores encontrados por (Katia Cury, 2012), la cual establece que el lactosuero entero y las altas concentraciones del inóculo al inicio de la fermentación favorecen una alta acidificación del medio.

Según la figura 3, se observa que el lactosuero desproteinizado al 1% de lactosa, arroja el valor de acidez más alto (10 g/l de ácido láctico) al igual que el lactosuero entero a la misma concentración (8,30 g/l de ácido láctico). No obstante, los valores de acidez más bajos observados, se encontraron en ambos lactosueros con un nivel de concentración de lactosa correspondiente al 10%.

Según la gráfica de efectos principales (figura 6), se observa que el lactosuero desproteinizado (B) y la baja concentración de lactosa favorece el incremento de la producción de ácido láctico. Los valores de acidez más altos se obtienen en los niveles de concentración de lactosa comprendidos entre 0 y 1 % respectivamente. Estos resultados coinciden con los encontrados por (Jakimec *et al.*, 2010) el cual establece que la mayor concentración de ácido láctico se obtiene para el suero desproteinizado sin adición de lactosa, el rendimiento de ácido láctico alcanzado en esta investigación fue de 10,3%, expresado como gramos de ácido láctico producido por gramo de sustrato consumido.

Se observa de igual manera que durante el proceso de acidificación transcurrido las 72 horas, los valores de pH se mantuvieron dentro del rango óptimo de actuación para *Lactobacillus casei* (5,31 – 5,60) según figura 20.

## ANALISIS ESTADISTICO

### Análisis de varianza

#### Diseño factorial de múltiples niveles

Factores: 2 Réplicas: 4  
Corridas base: 8 Total de corridas: 32  
Bloques base: 1 Total de bloques: 1  
Número de niveles: 2. 4  
Lactosuero Niveles: A y B  
Concentración Lactosa Niveles: 1.2.3.4

Tabla N° 9. Análisis de varianza de los resultados obtenidos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0,45591	0,065130	1,50	0,215
Lineal	4	0,44757	0,111891	2,58	0,063
LACTOSUERO	1	0,00781	0,007813	0,18	0,675
CONCENTRACION DE LACTOSA	3	0,43975	0,146584	3,38**	0,035
Interacciones de 2 términos	3	0,00834	0,002781	0,06	0,978
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA	3	0,00834	0,002781	0,06	0,978
Error	24	1,04176	0,043407		
Total	31	1,49767			

(\*\*) Diferencias altamente significativas

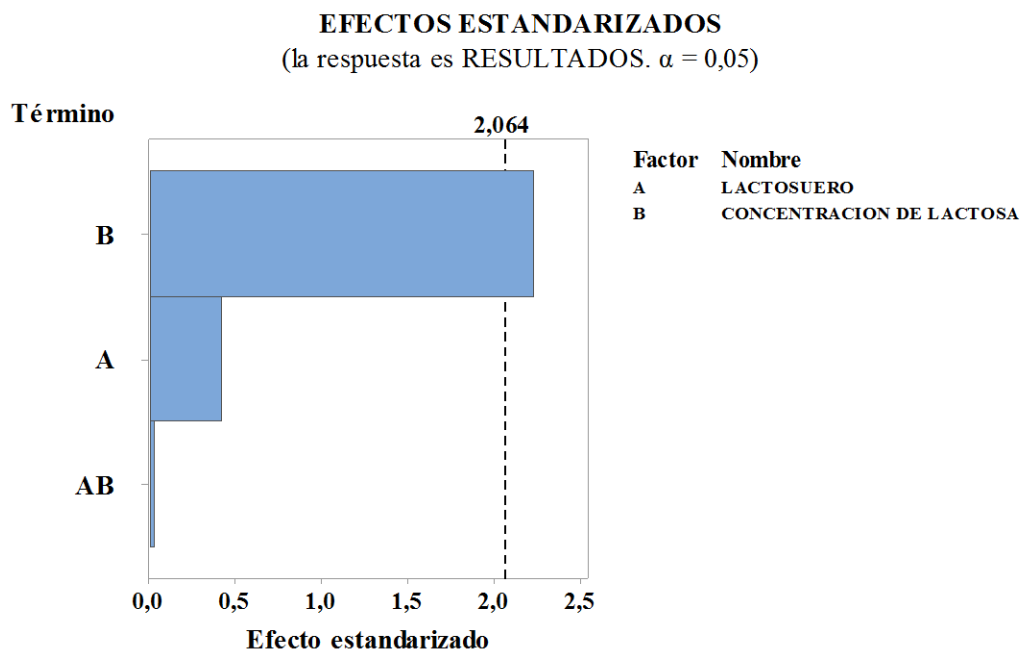


Figura 4. Diagrama de Pareto. Nivel de significancia para la aceptación o rechazo de los factores y su interacción de los resultados obtenidos de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).

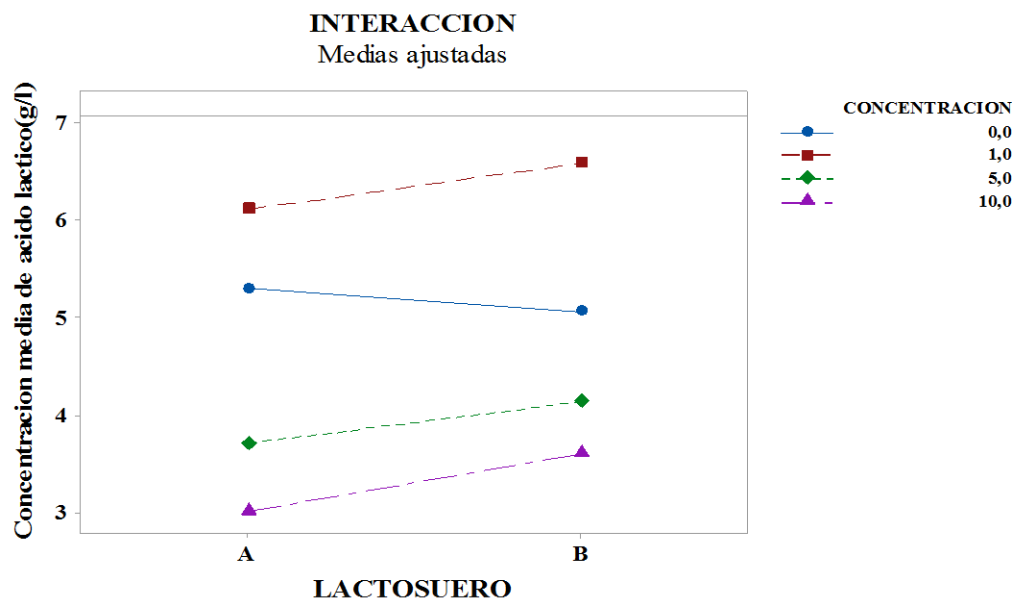


Figura 5. Acidificación con *L. casei* debido al efecto combinado del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B) y concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%)

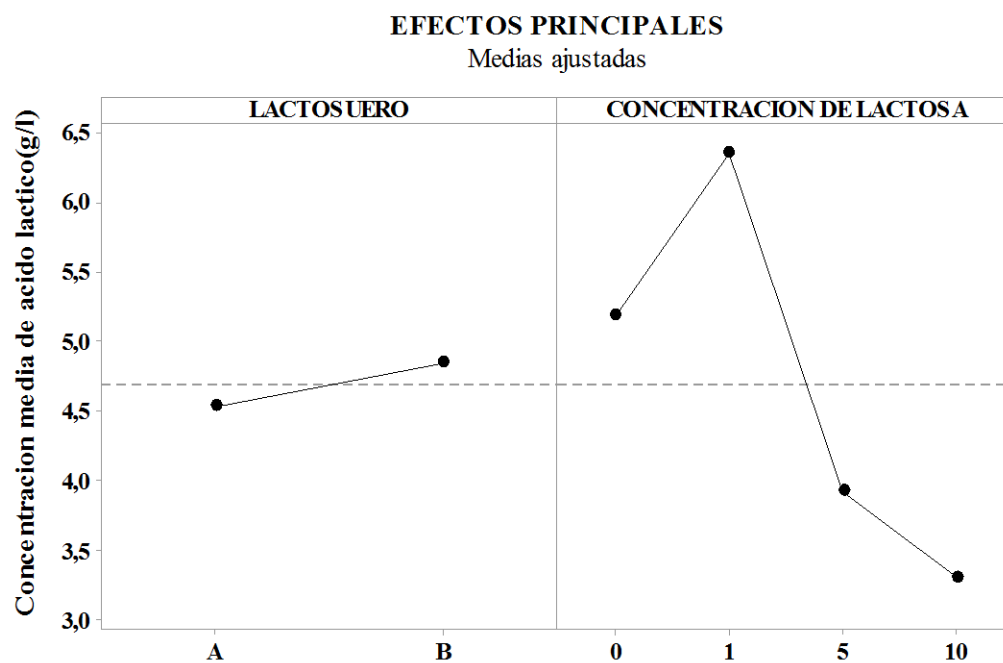


Figura 6. Efecto de la interacción del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B); y del porcentaje de concentración de lactosa suplementada para la acidificación (% de ácido láctico).

### 7.3 RELACIÓN DE LA CONVERSION DE LACTOSA A TRAVES DEL TIEMPO CON EL TIPO DE LACTOSUERO.

Tabla 10. Consumo de lactosa (g/l) en lactosuero entero y desproteinizado en función del tiempo de fermentación empleando *Lactobacillus casei*.

Tiempo de fermentación (Horas)				
Tratamientos	0	24	48	72
LDT	38,8±0,012	35,6±0,010	34,9±0,012	30,4±0,032
LDC1	60,4±0,016	58,9±0,015	44,6±0,020	28,6±0,030
LDC2	91,8±0,020	88,1±0,024	84±0,035	66,9±0,015
LDC3	97,5±0,023	96±0,030	95±0,080	87,3±0,030
LET	47,6±0,014	41,8±0,014	39,2±0,060	30,2±0,012
LEC1	65,1±0,015	60±0,012	56,1±0,014	39,2±0,018
LEC2	89,6±0,021	81±0,018	84,5±0,028	74,9±0,016
LEC3	95,2±0,025	94±0,021	93,5±0,026	92,9±0,018

(Valores promedios± desviación estándar)

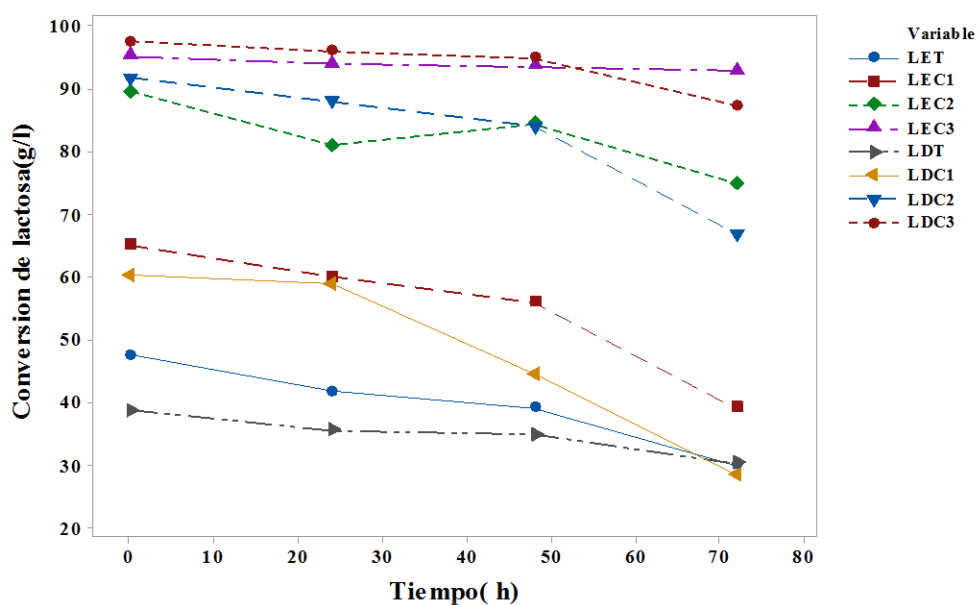


Figura 7. Efecto de la conversión de lactosa en ácido láctico, a través del tiempo de fermentación, a partir de lactosuero entero (LE) y desproteinizado (LD).

Se observa que el consumo de lactosa y su concentración en el tiempo de fermentación para ambos lactosueros entero y desproteinizado tienen un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la formación de ácido láctico. No obstante, el tipo de lactosuero y la interacción de ambos factores no posee un efecto significativo (figura 8).

Según figura 7, se observa que el mayor consumo de lactosa en el tiempo de fermentación establecido a las 72 horas, ocurren en lactosuero desproteinizado enriquecido al 1% de lactosa (52,64%) y en el lactosuero entero enriquecido a la misma concentración de lactosa (39,78%), durante el periodo de fermentación, para ambos lactosueros. De igual manera, el menor consumo de lactosa en el tiempo, se puede observar en los lactosueros (entero y desproteinizado) enriquecidos al 10% de lactosa, lo cual representa un 2,42% y 10,46% respectivamente. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de lactosa en el lactosuero, limita la conversión de esta para la producción de ácido láctico.

En relación a efectos simples, se puede observar que el mayor consumo de lactosa (disminución de lactosa en el tiempo), es favorecida en el lactosuero desproteinizado (B), en comparación con el lactosuero entero (A), a medida que disminuye la concentración de lactosa en el lactosuero (figura 9).

## ANALISIS ESTADISITICO

Tabla 11. Análisis de varianza de los resultados obtenidos del consumo de lactosa en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	16821,5	240307	32,51	0,000
Lineal	4	16744,6	4186,16	56,63	0,000
LACTOSUERO	1	66,1	66,12	0,89	0,354
CONCENTRACION DE LACTOSA	3	16678,5	5559,50	75,20**	0,000
Interacciones de 2 términos	3	76,9	25,62	0,35	0,792
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA	3	76,9	25,62	0,35	0,792
Error	24	1774,2	73,93		
Total	31	18595,7			

(\*\*) Diferencias altamente significativas

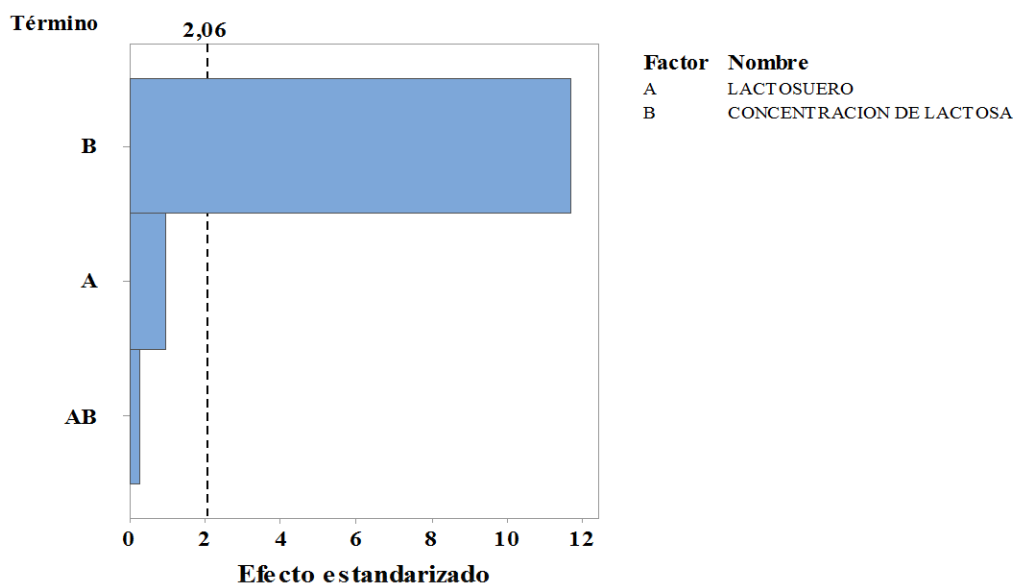


Figura 8. Diagrama de Pareto. Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , para la aceptación o rechazo de los factores y su interacción de los resultados obtenidos del consumo de lactosa con *Lactobacillus casei* para lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).



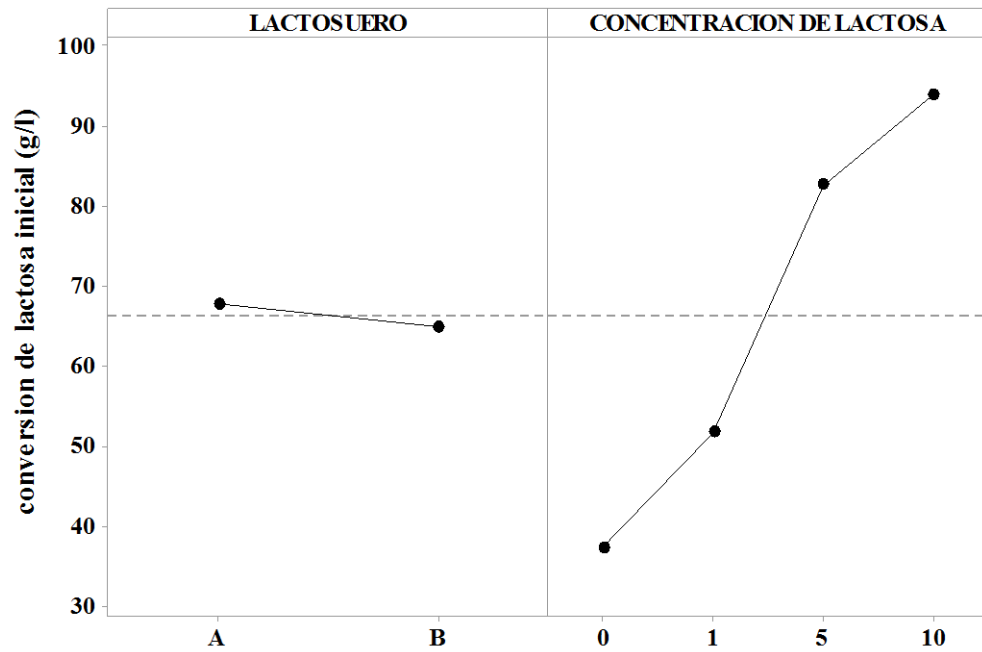


Figura 9. Disminución (Conversión) de lactosa con *Lactobacillus casei* debido al efecto combinado del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B) y concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%).

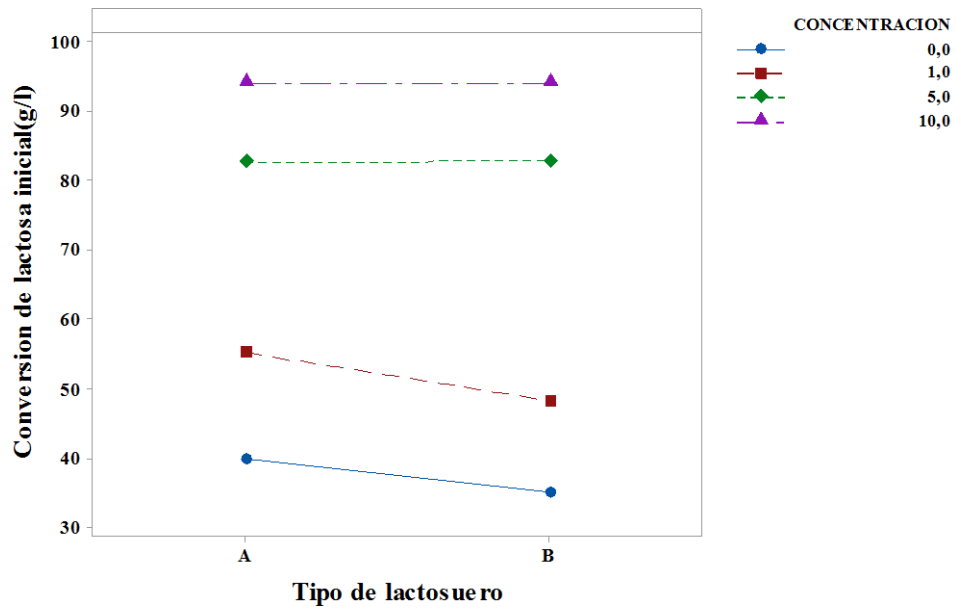


Figura 10. Efecto de la interacción del tipo de lactosuero Entero(A), desproteinizado (B); y los niveles de concentración de lactosa, en el consumo de lactosa a partir de *L. casei*.

## 7.4 PRODUCCION DE BIOMASA A TRAVES DEL TIEMPO CON EL TIPO DE LACTOSUERO Y CONCENTRACION DE LACTOSA.

Tabla 12. Producción de Biomasa expresada como peso seco (g/l) durante el periodo de fermentación en lactosuero entero y desproteinizado, empleando *Lactobacillus casei*.

Tiempo de fermentación (Horas)				
Tratamientos	0	24	48	72
LDT	14,00±0,012	20,6±0,030	22,40±0,016	25,58±0,012
LDC1	14,60±0,010	24,8±0,040	30,70±0,025	34,82±0,024
LDC2	15,40±0,018	32,80±0,024	48,00±0,040	69,56±0,020
LDC3	16,05±0,020	33,70±0,020	54,00±0,025	69,48±0,012
LET	13,80±0,014	15,70±0,016	23,00±0,040	29,90±0,016
LEC1	14,50±0,018	21,00±0,014	33,90±0,014	38,52±0,018
LEC2	15,80±0,020	28,90±0,012	65,84±0,012	72,12±0,014
LEC3	16,80±0,022	40,60±0,018	80,70±0,010	107,74±0,060

(Valores promedios± desviación estándar)

LDT: Lactosuero desproteinizado sin enriquecimiento. LDC1: Lactosuero desproteinizado al 1% p/v de lactosa, LDC2: Lactosuero desproteinizado al 5% p/v de lactosa LDC3: Lactosuero desproteinizado al 10% p/v de lactosa.

LDE: Lactosuero entero sin enriquecimiento de lactosa LEC1: Lactosuero entero al 1% p/v de lactosa, LEC2: Lactosuero entero al 5% p/v de lactosa LEC3: Lactosuero entero al 10% p/v de lactosa.

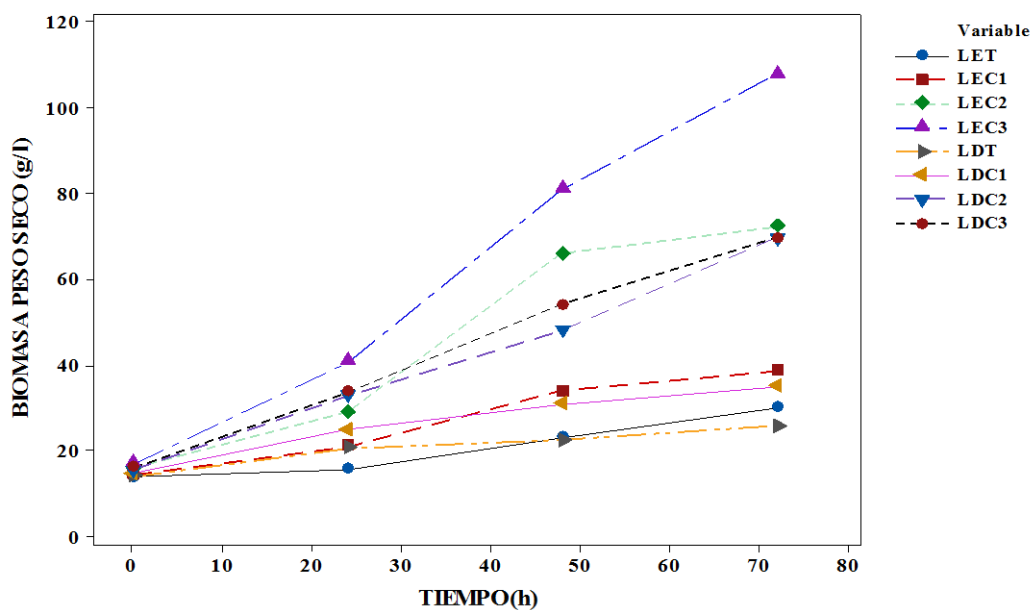


Figura 11. Efecto de la producción de biomasa a través del tiempo de fermentación, a partir de lactosuero entero (LE) y desproteinizado (LD).

En cuanto a la producción de biomasa hay un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de la concentración de lactosa y no del tipo de lactosuero o la interacción de estos (Figura 12). Se observan diferencias altamente significativas en el rango de concentraciones evaluadas, así como un incremento de la concentración de biomasa con el aumento de la concentración inicial de lactosa.

Según figura 11, la mayor producción de biomasa obtenida a las 72 horas de fermentación, se obtuvieron tanto en el lactosuero entero y desproteinizado suplementado al nivel de concentración de lactosa correspondiente al 10%, observándose que la concentración de biomasa aumenta con la concentración de lactosa para ambos lactosueros.

En relación a efectos principales (figura 14), se observa que el lactosuero entero(A) favorece la producción de biomasa con respecto al lactosuero desproteinizado (B), registrando un aumento de la producción de biomasa a medida que aumenta la concentración de lactosa.

Cabe destacar que el incremento de lactosa favoreció la producción de biomasa. Según Jurado (2009) y Ramírez *et al.*, (2011), las bacterias ácido lácticas requieren para su multiplicación de azúcares como lactosa y glucosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento.

Tabla 14. Análisis de varianza de los resultados obtenidos de la concentración de biomasa en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero entero(A) y desproteinizado (B)

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	7	5896,1	842,3	1,79	0,135
Lineal	4	5466,6	1366,7	2,91	0,043
LACTOSUERO	1	266,4	266,4	0,57	0,459
CONCENTRACION DE LACTOSA	3	5200,2	1733,4	3,69**	0,026
Interacciones de 2 términos	3	429,5	143,2	0,30	0,822
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA	3	429,5	143,2	0,30	0,822
Error	24	11280,4	470,0		
Total	31	17176,5			

(\*\*) Diferencias altamente significativas

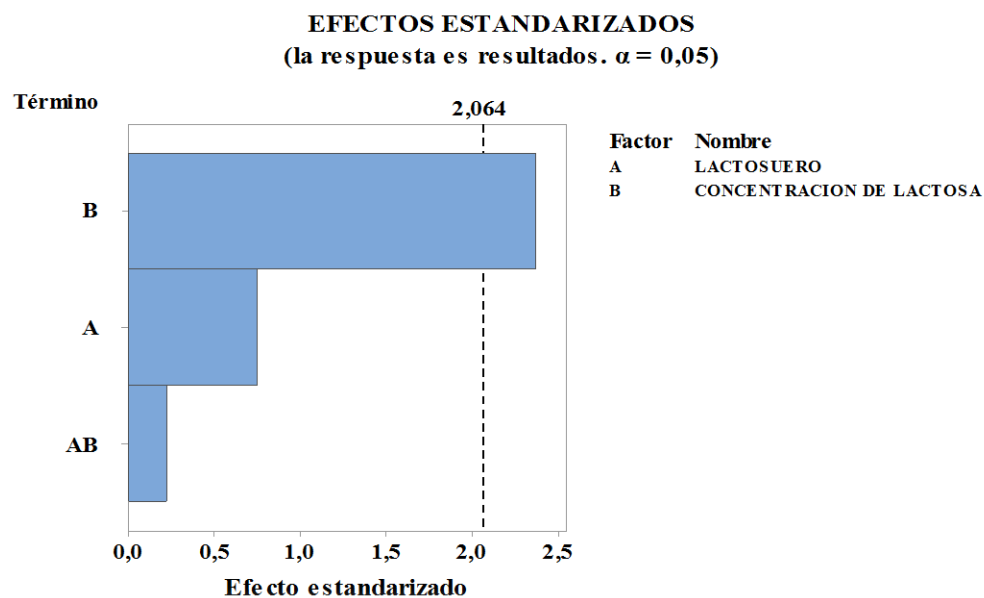


Figura 12. Diagrama de Pareto. Nivel de significancia para la aceptación o rechazo de los factores y su interacción de los resultados obtenidos de la producción de biomasa con *L. casei* para lactosuero entero(A) y desproteinizado (B).

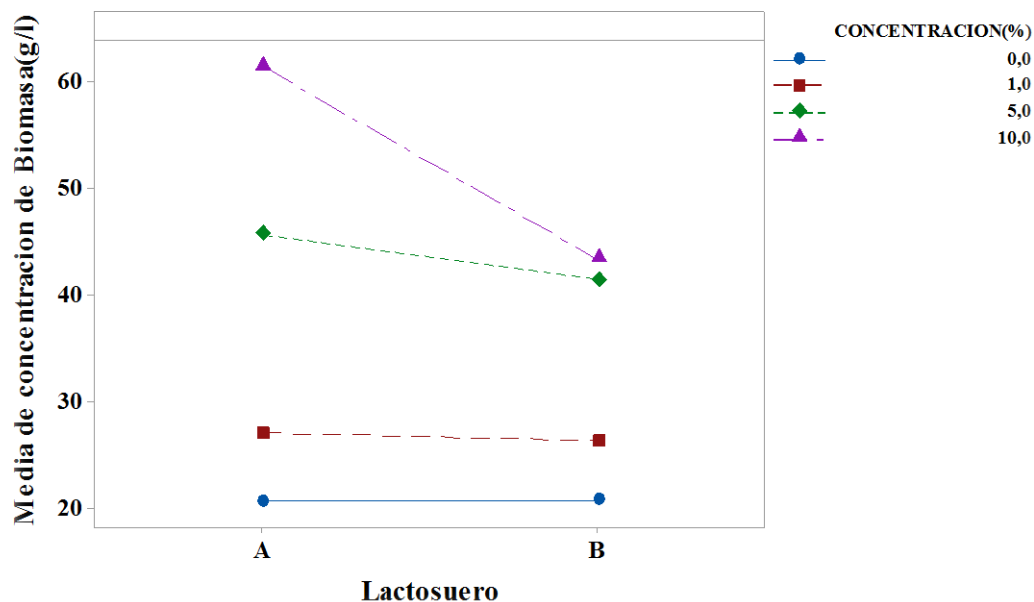


Figura 13. Efecto de la interacción del tipo de lactosuero Entero(A), desproteinizado (B); y de la concentración de lactosa en la producción de biomasa.

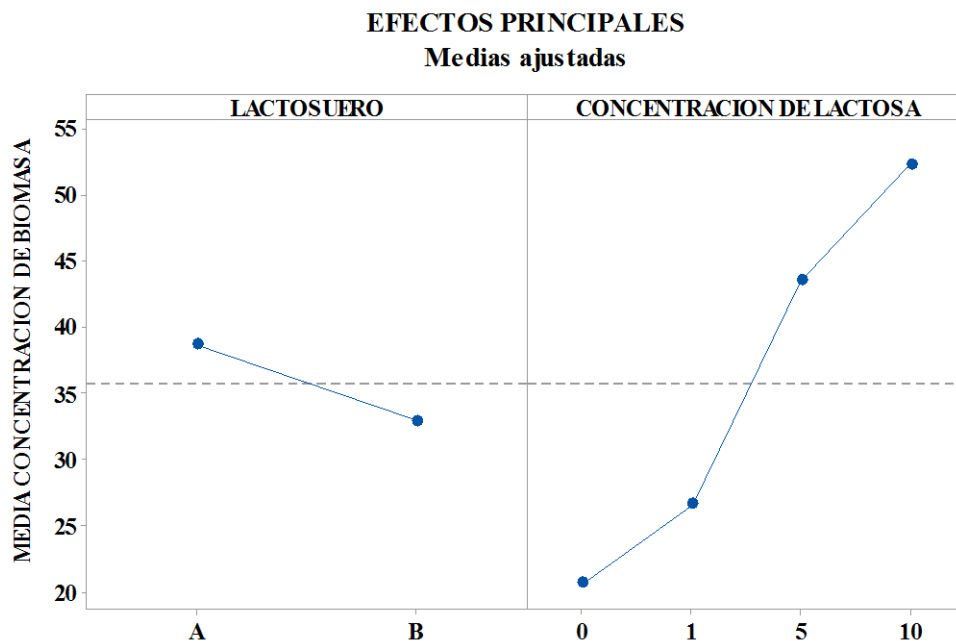


Figura 14. Producción de biomasa con *L. casei* debido al efecto combinado del tipo de lactosuero entero(A), desproteinizado (B) y concentración de lactosa suplementada (0, 1, 5 y 10%)

## 7.5 ESTIMACION DE PARAMETROS CINETICOS

Entre los tratamientos 1 y 4 (0 y 10% de lactosa), se encuentra la variación máxima y mínimo de rendimiento ( $Y_p/s$ ). Para el lactosuero desproteinizado los rendimientos varían de 0,47 a 0,09 (g ácido láctico/ g lactosa) respectivamente, observándose un aumento del rendimiento a medida que disminuye la concentración de lactosa. Este comportamiento es similar en el lactosuero entero en los tratamientos 6 y 8. Según la figura 16, el mayor y menor rendimiento se obtuvieron en el lactosuero entero enriquecido al 1 y 10% de lactosa (0,23 y 0,08 g ácido láctico/ g lactosa) respectivamente, coincidiendo de esta manera con los hallazgos encontrados por (Carlos *et al*, 2012), el cual establece que el rendimiento de ácido láctico ( $Y_p/s$ ) decrece con el aumento de la concentración de lactosa.

Por otro lado, en todas las fermentaciones realizadas en este estudio el rendimiento observado de sustrato en producto ( $Y_{p/s}$ ) fue menor que el de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s}$ ) (Tablas 14). Esto indica que las condiciones de fermentación fueron apropiadas para favorecer la producción de biomasa sobre la producción de ácido láctico.

Las mayores producciones de ácido láctico con respecto a la biomasa ( $Y_{p/x}$ ) se obtuvieron en el lactosuero desproteínizado, enriquecidos al 0 y 1% de lactosa (0,34 g de ácido láctico por cada gramo de biomasa producida), según figura 15. La mayor producción volumétrica (Q), se obtiene en el lactosuero desproteínizado enriquecido al 1% de lactosa (1,39 g/l de ácido láctico. hora), según figura 19. Estos resultados son similares a los encontrados por (Carlos *et al.*, 2012), los cuales obtuvieron una productividad máxima de (1,1 g/l de ácido láctico. hora). El coeficiente de rendimiento  $Y_{p/s}$  varió de 0,5306 - 0,2488 g. l<sup>-1</sup> para 47,9 g.l<sup>-1</sup> y 87,72 g.l<sup>-1</sup> de lactosa inicial.

Al comparar los valores arrojados por (Carlos *et al.*, 2012) donde el 84,0 al 77,4% de lactosa fue utilizada después de 21 horas de fermentación con los arrojados en esta investigación después de 72 horas, donde se observó que existe un 52,64 y 39,78 % de utilización de la lactosa en el lactosuero desproteínizado y entero enriquecido al 1% de lactosa, se evidencia, que el enriquecimiento combinado con una fuente de carbono y nitrógeno( lactosa y sulfato de amonio) permite una mayor aprovechamiento en menor tiempo para la utilización del sustrato.

Tabla 14. Parámetros Cinéticos después de 72 horas de fermentación, en lactosuero entero y desproteinizado empleando *Lactobacillus casei*.

Variable de estudio	%Consumo de				
Tratamientos	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$	lactosa	$Q_p(g/l.h)$
LDT(1)	1,38	0,47	0,34	21,65	0,9022
LDC1(2)	0,64	0,22	0,34	52,64	1,39
LDC2(3)	1,31	0,11	0,087	27,12	0,75
LDC3(4)	5,24	0,09	0,017	10,46	0,78
LET(5)	0,93	0,19	0,20	36,55	1,041
LEC1(6)	0,93	0,23	0,25	39,78	1,18
LEC2(7)	3,83	0,12	0,03	16,40	0,625
LEC3(8)	39,5	0,08	0,012	2,42	0,49

$Y_{x/s}$  (Rendimiento en biomasa con respecto a ácido láctico producido),  $Y_{p/s}$  (Rendimiento de ácido láctico a partir del sustrato),  $Y_{p/x}$  (Rendimiento de ácido láctico con respecto a la biomasa), consumo de lactosa y producción volumétrica de ácido láctico

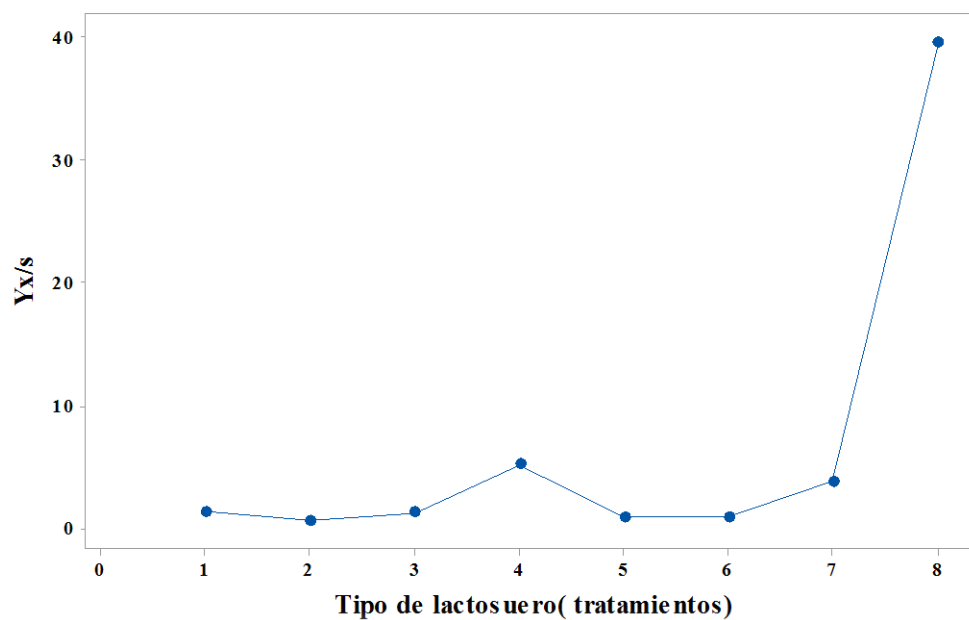


Figura 15 .Rendimiento en biomasa en funcion del sustrato consumido(Lactosa) despues de 72 horas de fermentacion en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.



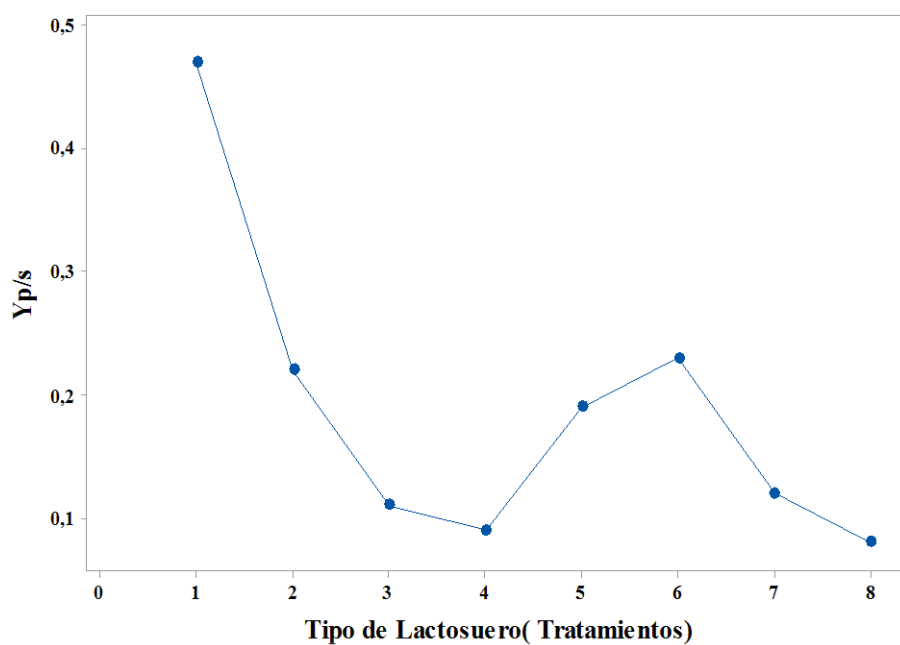


Figura 16. Rendimiento de acido lactico en funcion del sustrato consumido(Lactosa) despues de 72 horas de fermentacion en lactosuero entero y desproteinizado a iferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.

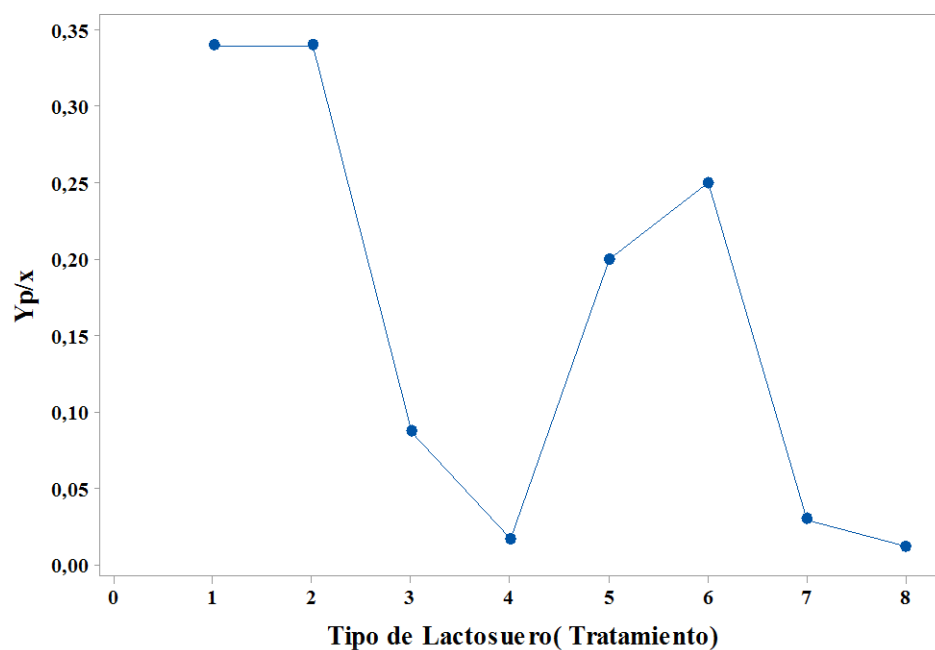


Figura 17. Rendimiento de acido lactico en funcion de la biomasa despues de 72 horas de fermentacion en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.

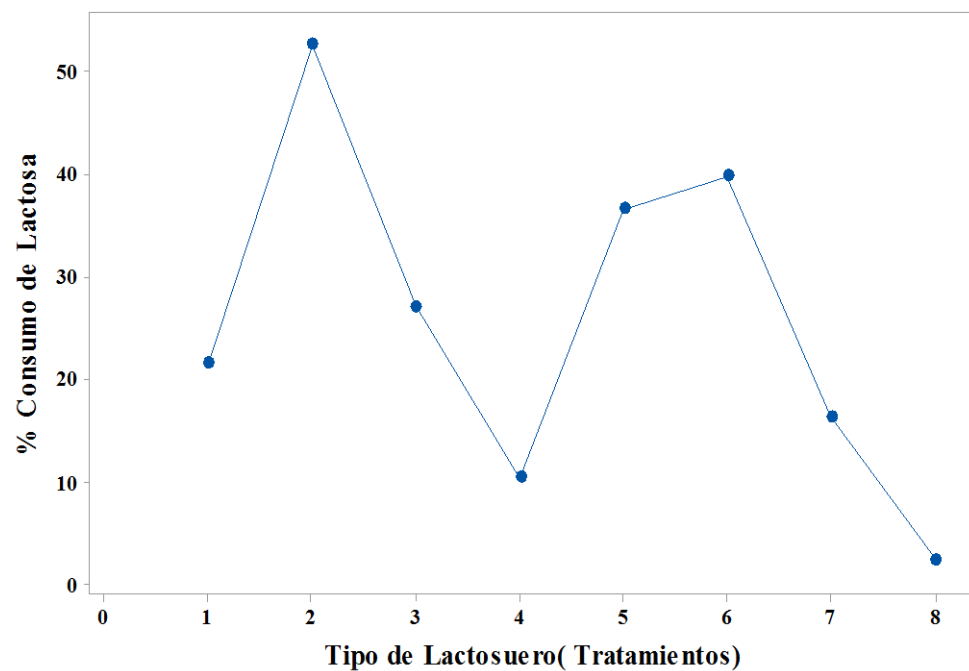


Figura 18. Consumo de lactosa despues de 72 horas de fermentacion en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa

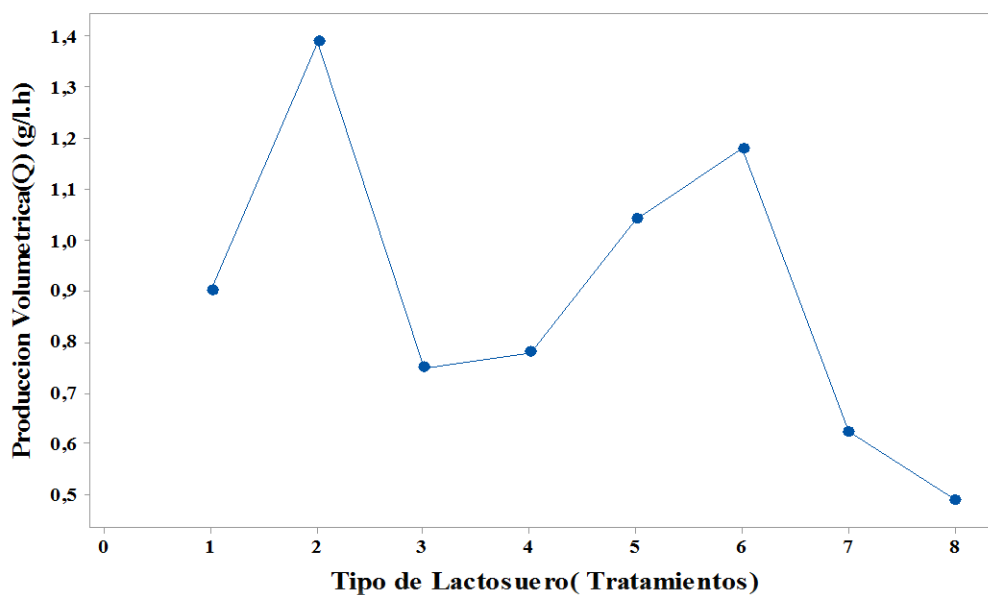


Figura 19. Produccion volumetrica de acido lactico despues de 72 horas de fermentacion en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.

Tabla 15. Variación del pH durante el periodo de fermentación para ambos lactosueros (Entero y desproteinizado).

Tipo de Lactosuero	pH
LDT	5,56
LDC1	5,42
LDC2	5,31
LDC3	5,54
LET	5,65
LEC1	5,60
LEC2	5,57
LEC3	5,60

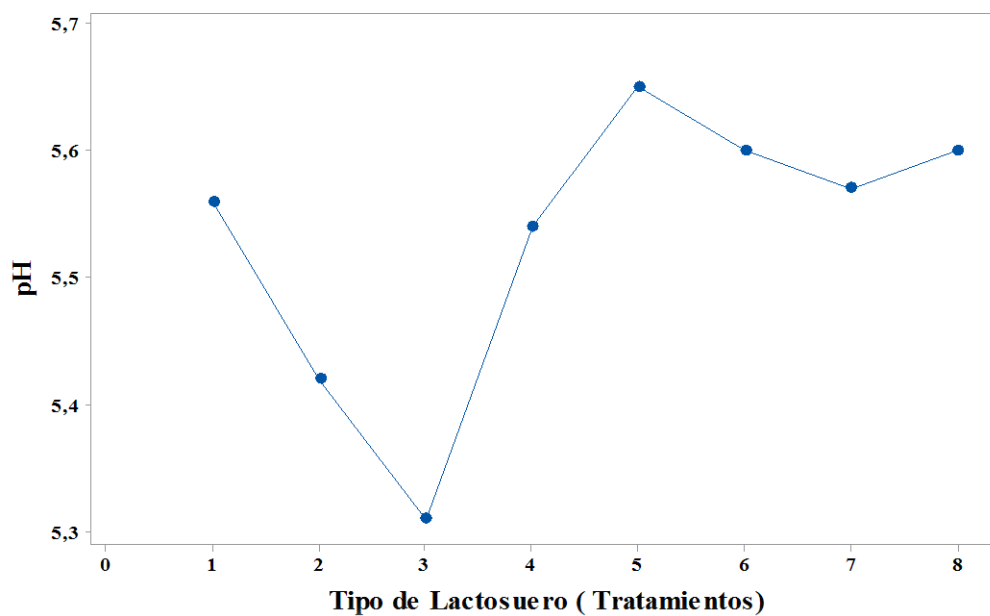


Figura 20. Variacion del pH despues de 72 horas de fermentacion en lactosuero entero y desproteinizado a diferentes concentraciones de enriquecimiento con lactosa.

## VIII CONCLUSIONES

El lactosuero es una materia prima favorable para producir ácido láctico mediante el proceso de fermentación por *Lactobacillus casei*.

El lactosuero empleado presento características físicas y químicas viables desde el punto de vista biotecnológico para ser usado en la producción de ácido láctico.

En relación a los parámetros cinéticos evaluados, se obtuvo un máximo rendimiento de ácido láctico con respecto al sustrato consumido en el lactosuero desproteinizado sin suplementación de lactosa (0,47 g ácido láctico/ g lactosa). La mayor producción volumétrica (Q), se obtiene en el lactosuero desproteinizado enriquecido al 1% de lactosa (1,39 g/l de ácido láctico. hora).

El tipo de lactosuero (entero y desproteinizado) y la interacción de los factores evaluados a los diferentes niveles no tiene un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico, producción de biomas y conversión de lactosa. No obstante, la concentración de lactosa en el tiempo de fermentación si posee un efecto significativo en cada uno de los tratamientos, sobre la producción de ácido láctico y biomasa.

El enriquecimiento con lactosa favorece a la producción de biomasa durante el proceso de fermentación del lactosuero con *Lactobacillus casei*.

La alta concentración de lactosa inhibe la producción de ácido láctico durante el proceso de fermentación del lactosuero empleando *Lactobacillus casei*.

El *Lactobacillus casei* se desarrolla con un alto rendimiento en ácido láctico, que se reduce al incrementarse la concentración inicial de lactosa (fuente de carbono) en el medio.

## IX RECOMENDACIONES

Para evaluar el proceso fermentativo en la producción de ácido láctico se debe suplementar el lactosuero objeto de estudio, con una combinación de fuentes de carbono, nitrógeno y minerales.

Realizar estudios que conlleven al uso de la biomasa de *Lactobacillus casei* obtenida a partir de lactosuero, orientados a la aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y química.

## X BIBLIOGRAFIA

- Alejandra, *et al.*, (2009). **Composición química y enriquecimiento del lactosuero de leche de caprino para la producción de ácido láctico con *Lactobacillus helveticus***. Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingenierías. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental – Volumen 3 Número 2 – julio-diciembre 2009 – ISSN 2145-6097
- Alexandra, *et al.*, (2012). **Método de superficie de respuesta para optimizar las condiciones de producción de ácido láctico a partir de subproductos lácteos**. Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería, Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia. Nova, Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Issn: 1794-2470 - Vol. 10 No. 18 Julio - Diciembre de 2012: 135 – 250
- Almeida, (2009). **Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria**. LWT - Food Science and Technology 42(2): 672–678.
- Alvarez, (2004). **Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de blis del lactobacillus casei y optimización de los parámetros propuestos**. Recuperado el 23 de septiembre de 2014, de <http://intellectum.unisabana.edu.co:8080/jspui/bitstream/10818/4999/1/130101.pdf>
- Arriaga, (2013). **Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana**. Recuperado el 20 de Septiembre de 2014, de <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/891/1/RI000453.pdf>
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Manual of Official Methods of Analysis. 13th Edition**. Washington DC: 1990.
- Berruga, (1999). **Desarrollo de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería"**. Tesis doctoral. Universidad Complutence de Madrid. Facultad de veterinaria. España.
- Bonilla, (2013). **Obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* y *bulgaricus***. Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas. (23) 18-24.
- Britania, (2010). **M.R.S Agar**. Recuperado el 24 de Septiembre de 2014, de [http://www.britanialab.com/productos/404\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/404_hoja_tecnica_es.pdf)

- Cámara Venezolana de Industrias Lácteas (CAVILAC), (2008). **La industria lechera en Venezuela**. Su evolución. Caracas, Venezuela. 58pp
- Caminotti, (1993). **Plan de mejoramiento de la producción porcina**. ISSN 0327 - 6732. Hoja informativa N° 243, EEA, INTA Marcos Juárez. Argentina.
- Carlos *et al.*, (2012). **Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei***. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol. 11 No. 1 (136 - 143).Grupo Investigación Procesos y Agroindustria de Vegetales. Universidad de Córdoba.
- Collins *et al.*, (1989). **Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov.** Int. J. systematic Bacteriol. 39, 105-108.
- COVENIN, (1077:1997). **Comisión Venezolana de Normas Industriales. Leche y sus derivados**. Determinación de humedad. Segunda revisión.
- COVENIN, (658:1997). **Comisión Venezolana de Normas Industriales. Leche y sus derivados**. Determinación de acidez titulable. Tercera revisión.
- COVENIN, (367:82). **Comisión Venezolana de Normas Industriales. Leche fluida**. Determinación de densidad relativa. Primera revisión.
- Cury *et al.*, (2014). **Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei***. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XVI, núm. 1, julio, 2014, pp. 137-145.Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Dicks *et al.*, (1996). **Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC15820 as *Lactobacillus zaes* nom. Rev;** designation of ATCC 334 as the neotype of *L.casei sub. casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. Int J Syst. Bacteriol, 46, 337-340.
- Escobar *et al.*, (2010). **Evaluación el crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno**. Rev. Invest. Univ. Quindío (20): 42 - 49. Armenia – Colombia.
- Foegeding, E. and P. Luck, (2002). **Whey protein products**. 1957-1960.In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition. Academic Press, New York.
- García, C. (2010). **Revisión documental de la producción de ácido láctico por vía biotecnológica**. Temas Agrarios - Vol. 15:(2) Julio - Diciembre 2010 (9 - 26).Universidad de Córdoba, Montería, Colombia

- Ghaly, A. y Kamal. M (2004). **Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction**. Water Research 38(3): 631-644.
- Gómez, T., Hernández, M., López, j., Cabrera, R., Ramón, L., Juárez, J. y Ramírez, E. (2010). **Caracterización sensorial del queso fresco “cuajada” en tres localidades de Oaxaca, México: diferencias en la percepción sensorial**. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1(2):127-140.
- Guerrero *et al.*, (2012). **Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores uasb**. Centro de Investigaciones Químicas, ICBI, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México Tecnología Química 33(1): 99-106
- Gutiérrez, E. (2006). **Desarrollo de una bebida de suero dulce derivado de la fabricación de queso fresco, fermentada con cultivos *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus salivarius var thermophilus* (TCC-20), adicionada con cultivo probióticos *Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei* LC-01**. Tesis para optar el título de licenciado en tecnología de alimentos. Costa Rica. Pag 7.
- Heliodoro *et al.*, (2009). **Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: procesos de separación y purificación**. Tecno. Ciencia Ed.(IMIQ) 23(2):79-90,2009.
- Henry, J. (2014).**Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos**. Veterinaria y Zootecnia ISSN 2011.Vol 8 No.2, julio diciembre de 2014.
- Hernández, A. (2003). **Microbiología Industrial**. (1° Edición). Editorial EUNED Costa Rica..
- International Dairy Federation (IDF). (1987). **Trends in Whey Utilization**. Bulletin 212:171 pp.
- Inda, A. (2000). **Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de la Quesería. Capítulo IV. Opciones para darle valor agregado al lactosuero de quesería**. Editado por Organización de los Estados Americanos (OEA). División de Ciencia y Tecnología: pp. 63-93. México.
- Jakimec *et al.*, (2010).**Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato empleando *Lactobacillus. Bulgaricus***. Revista Científica - 2001 - Vol XI - No. 001
- Jelen, P. (2003). **Whey processing. Utilization and Products**. 2739-2745. In: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, London, UK.



- Jurado, H. (2009) **Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos.** Valle del Cauca, Colombia: Universidad del Valle. 170p. Tesis (Doctorado en Ingeniería de Alimentos).
- Kandler, O. y Weiss, N. (1986). **Section 14 regular, nonsporing Gram-positive rods.** En Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Ed), **Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore E.U.A. Williams & Wilkins, 2:1208-1234
- Lagua, H. (2011). **Elaboración de una bebida nutritiva a partir de la pulpa de maracuyá (*pasiflora incarnata*), y suero láctico, en la planta procesadora de frutas y hortalizas.** Facultad de ciencias agropecuarias, recursos naturales y del ambiente, escuela de ingeniería agroindustrial. La universidad estatal de Bolívar. Guaranda – Ecuador.
- Ley Orgánica del Ambiente, (2006). **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5833.** Asamblea Nacional. 52 pp.
- Ley Penal del Ambiente, (1992). **Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 4358E.** Congreso de la República de Venezuela. 14 pp
- Londoño, M. (2008). **Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos.** Perspectivas en nutrición humana. Revista Perspectivas en Nutrición Humana. Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia **16: 11-20.**
- Monsalve, J. y González, D. (2005). **Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida.** Revista Científica Universidad de Zulia, FCV – LUZ. 15(6) :543-550. ISSN 0798-2259. Venezuela
- Muñi *et al.*, (2005). **Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero.** Revista Científica 15(4): 361–367.
- Oreopoulou, V. y Russ, W. (2007). **Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry.** Springer Science+Business Media, LLC.
- Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. (2007). **Bioutilisation of whey for lactic acid production.** Food Chemistry 105: 1-14.
- Pelayo, M. (2009). **Lactosuero, residuo o aditivo alimentario.** Eroski Consumer. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnología/2009/10/15/188582.php>
- Saizar, C. (2004). **Producción más Limpia para la Mejora de la Gestión Ambiental de las PyMES.** Rev Industria Lechera. LXXXV (736):26-33

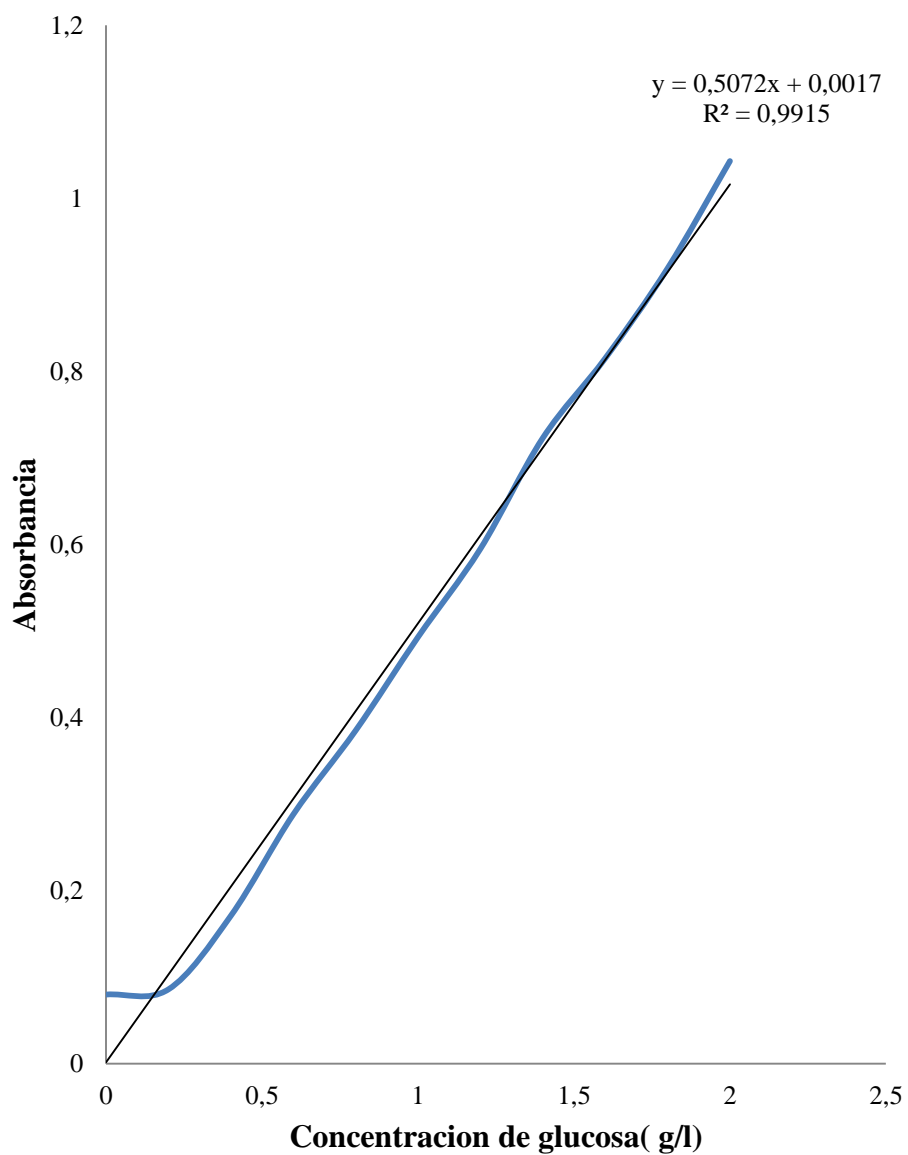
- Serna, L y Naranjo, E (2005). **Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactotococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentación en discontinuo.** Revista Colombiana de Biotecnología. 7(1):32-38. Pag 34
- Serna, L y Rodríguez, A (2007). **Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L).** Chile. 67(1):29-38. Pag 31.
- Suárez, (2009). **Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei atcc 7469*.** Disponible en: <http://hdl.handle.net/10784/394>.
- Tamayo, M. (2001). **El proceso de investigación científica (3ra edición).** Ciudad de México, México: Editorial Limusa, S.A.
- Urribarrí *et al.*, (2009). **Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo.** Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, N° 4, 297 - 302, 2004.
- Valencia E. y Ramírez, M. (2009). **La industria de la leche y la contaminación del agua.** Elementos. 16(73):27-31.
- Vega, (2006). **Viabilidad de *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus* en Jugo de Cranberry.** Recuperado el 23 de Septiembre de 2014, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fav727v/doc/fav727v.pdf>
- Vicente *et al.*, (2009) **Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental.** Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Valledupar, César, Colombia.
- Vijayakumar, J., Aravindan, R. y Viruthagiric, T. (2008). **Recent trends in the production, Purification ant application of Lactic Acid.** Chemical and Ciochemical Engenniering 22(2): 245-264.
- Villanueva, (2007). **Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso Paipa.** Recuperado el 23 de Septiembre de 2014, de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/6749/1/13992026.pdf>
- Vonshak, A. y Maske, H. (1982). **Algae: Growth Techniques and Biomass Production. En: Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis.** Coombs, J. y Hall, D.O. (eds). Pergamon Press. Section 3. 62-77 pp.

## **Anexos**

**Anexo A. Datos en la obtención de la curva patrón de glucosa, para la determinación de lactosa por el método DNS.**

X	Y
(Concentración de glucosa en g/l)	(Absorbancia)
0	0,08
0,2	0,086
0,4	0,171
0,6	0,288
0,8	0,385
1	0,493
1,2	0,595
1,4	0,723
1,6	0,815
1,8	0,919
2	1,043

**Anexo B. Curva de calibración de glucosa para la determinación de lactosa en lactosuero a partir del método DNS.**



### **Anexo C. Cálculos típicos para la determinación de lactosa a partir de la curva de calibración de glucosa.**

Una vez medida la absorbancia a 540 nm previa dilución de la muestra en 100 ml, se obtuvo el siguiente resultado:

Muestra: Lactosuero entero testigo (LET) Nivel de concentración= 0% ( sin enriquecimiento de lactosa)

Lectura de Absorbancia= 0,16

Según curva de calibración la ecuación que relaciona la absorbancia con la concentración de glucosa es:

$$A = 0,5072 C + 0,0017$$

Despejando C (concentración), se tiene:

$$C = \frac{A - 0,0017}{0,5072} = \frac{0,16 - 0,0017}{0,5072} = 0,312 \text{ g/l de glucosa}$$

Concentración de lactosa= 0,312 g/l . 1,9 = 0,59 g/l de lactosa

Aplicando factor de dilución:

$$100. 0,59 \text{ g/l} = 59 \text{ g/l}$$

$$\% \text{ de lactosa} = \frac{59 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 100 = 5,9 \% \text{ p/v}$$

## Anexo D. Resultados de la determinación de Biomasa por peso seco.

Volumen de muestra= 5 ml

Muestra	Peso P.V	Peso P.V +M ( Antes de secado)	Peso P.V +M ( Después de secado)
LDT	41,84	46,8444	41,9679
LDC1	37,2338	42,2592	37,4079
LDC2	34,7365	39,8219	35,0843
LDC3	33,8955	39,9983	34,2429
LET	38,7697	437.976	38,9192
LEC1	49,4009	54,4131	49,5935
LEC2	43,4718	48,543	43,8324
LEC3	44,6209	49,7574	45,1596

P.V: peso de capsula de Petri vacía

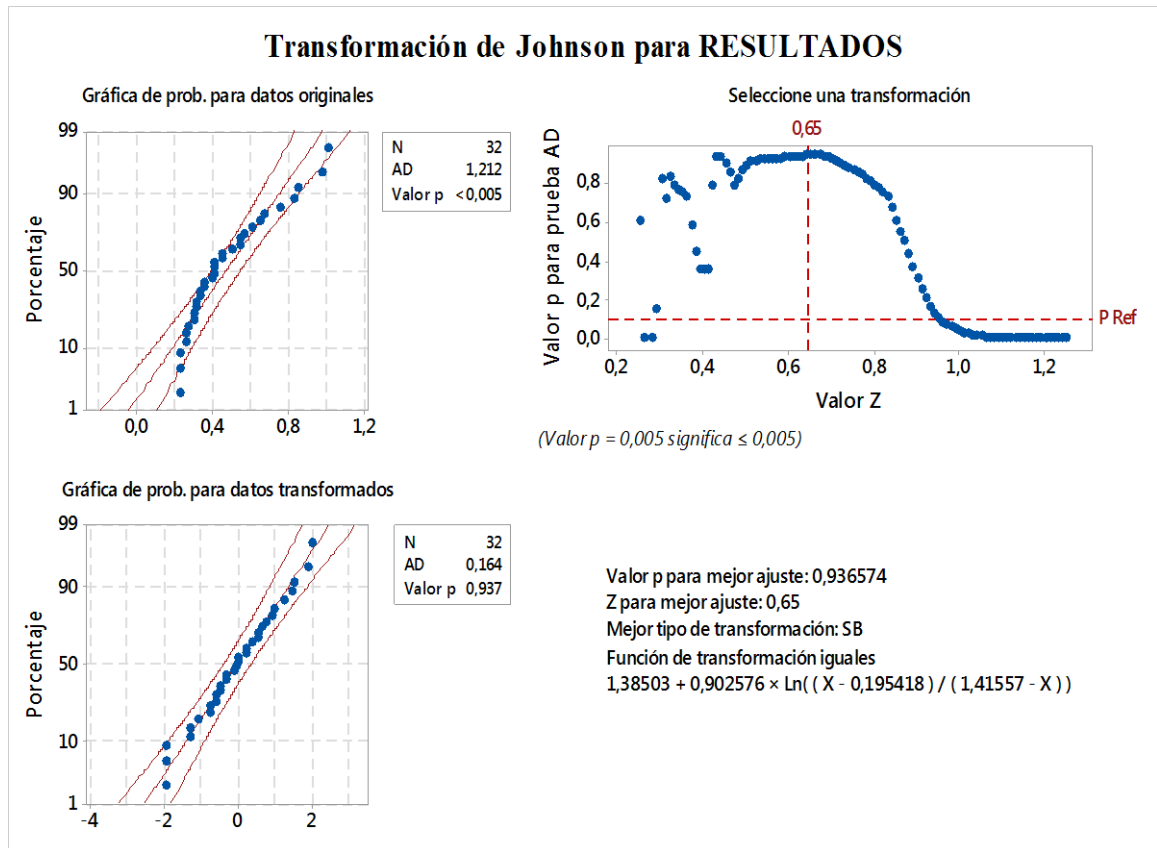
P.V + M: peso de capsula de Petri vacía + muestra

Lactosuero	Concentración de Biomasa ( g/l)	Peso	dx	Ds	Rendimiento en biomasa(dx/ds)
LDT	25,58	0,1279	25,58	8,4	3,04
LDC1	34,82	0,1741	34,82	31,8	1,09
LDC2	69,56	0,3478	69,56	24,9	2,80
LDC3	69,48	0,3474	69,48	10,2	6,81
LET	29,9	0,1495	29,9	17,4	1,72
LEC1	38,52	0,1926	38,52	25,9	1,49
LEC2	72,12	0,3606	72,12	14,7	4,9
LEC3	107,74	0,5387	107,74	2,3	46,84

dx: Diferencial de concentración en biomasa ds: Diferencial de la concentración de lactosa

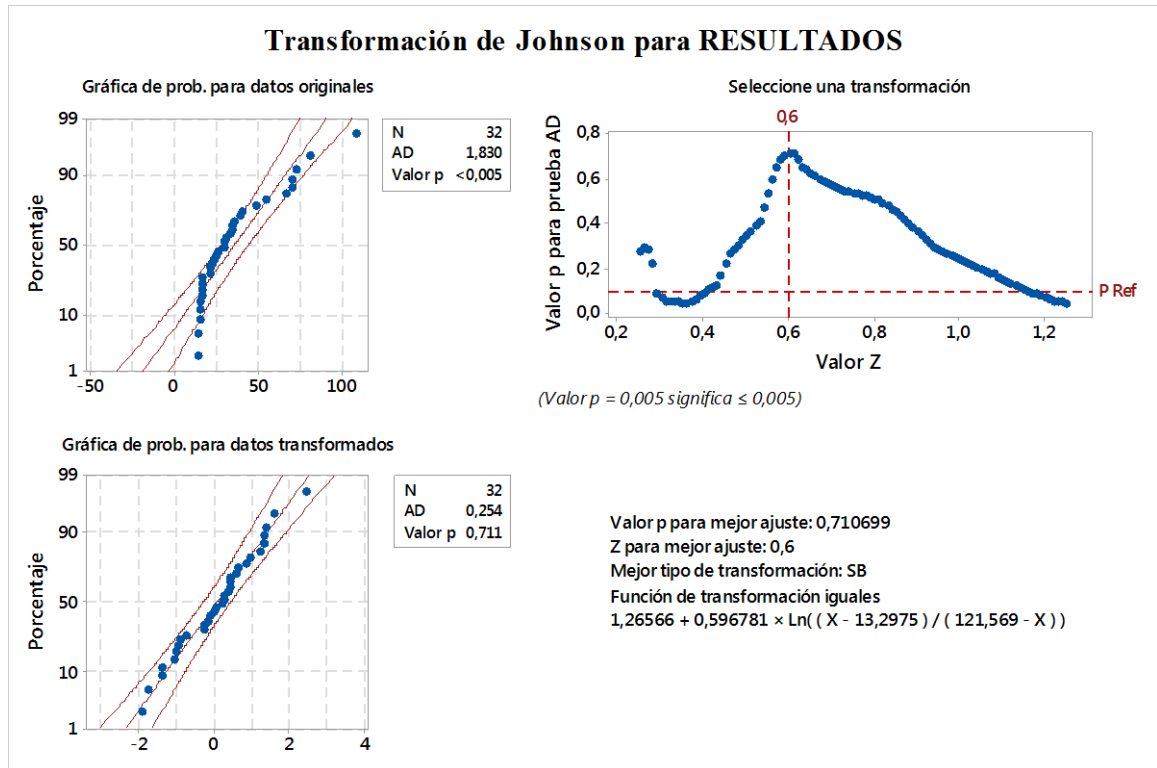
% Concentración de Biomasa= peso/ volumen x 1000

## Anexo E. Prueba de normalidad y ajuste para los datos arrojados de la producción de ácido láctico.

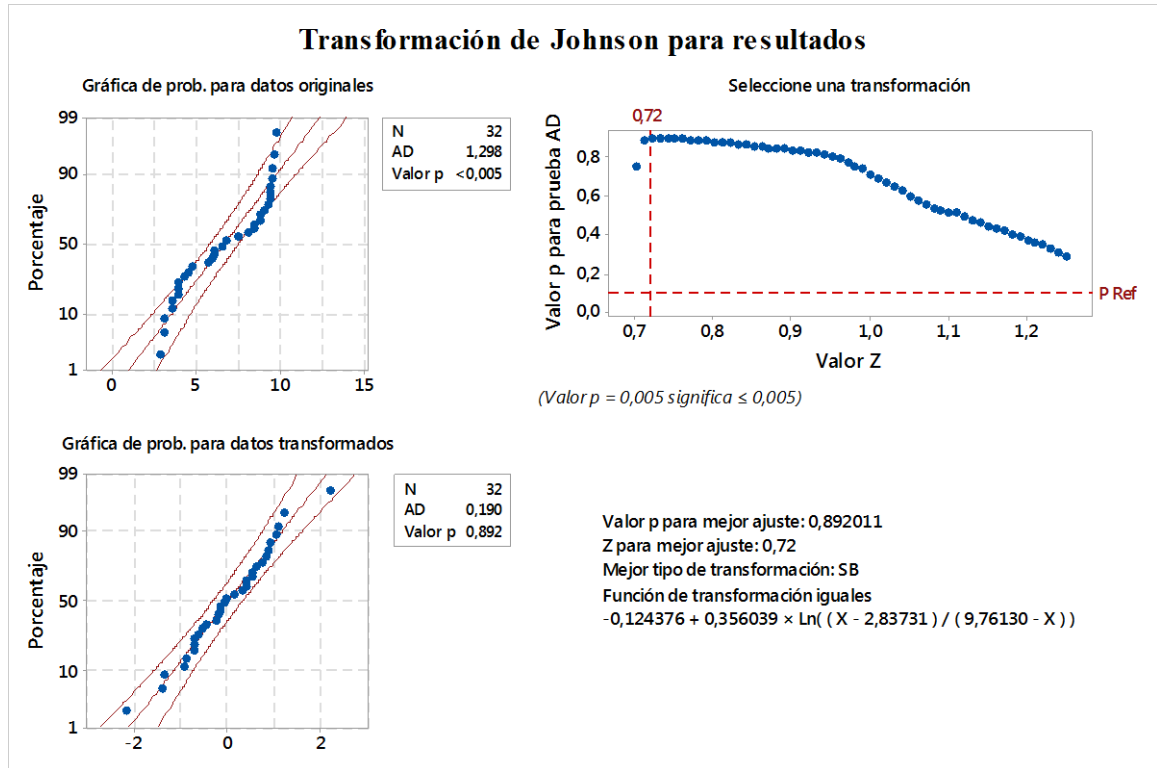




## Anexo F. Prueba de normalidad y ajuste para los datos arrojados de la producción de biomasa.



## Anexo G. Prueba de normalidad y ajuste para los datos arrojados del consumo de lactosa.



**Anexo H. Datos arrojados del análisis de varianza para la producción de ácido láctico empleando Minitab 18.**

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	LACTOSUERO	CONCENTRACION DE LACTOSA	RESULTADOS
1	1	1	1	A	0	2,7
2	2	1	1	A	1	2,25
3	3	1	1	A	5	2,25
4	4	1	1	A	10	2,25
5	5	1	1	B	0	2,55
6	6	1	1	B	1	3,15
7	7	1	1	B	5	2,55
8	8	1	1	B	10	3,15
9	9	1	1	A	0	5
10	10	1	1	A	1	5,4
11	11	1	1	A	5	4,1
12	12	1	1	A	10	3
13	13	1	1	B	0	4,5
14	14	1	1	B	1	3,5
15	15	1	1	B	5	3
16	16	1	1	B	10	3,3
17	17	1	1	A	0	7,5
18	18	1	1	A	1	8,5
19	19	1	1	A	5	4,5
20	20	1	1	A	10	3,5
21	21	1	1	B	0	6,7
22	22	1	1	B	1	9,7
23	23	1	1	B	5	5,6
24	24	1	1	B	10	3,9
25	25	1	1	A	0	6
26	26	1	1	A	1	8,3
27	27	1	1	A	5	4
28	28	1	1	A	10	3,3
29	29	1	1	B	0	6,5
30	30	1	1	B	1	10
31	31	1	1	B	5	5,4
32	32	1	1	B	10	4,05

# Regresión factorial general: Resultados vs. ... Concentración de lactosa .Información del factor

Factor	Niveles	Valores
LACTOSUERO	2	A. B
CONCENTRACION DE LACTOSA	4	0. 1. 5. 10

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0,45591	0,065130	1,50	0,215
Lineal	4	0,44757	0,111891	2,58	0,063
LACTOSUERO	1	0,00781	0,007813	0,18	0,675
CONCENTRACION DE LACTOSA	3	0,43975	0,146584	3,38	0,035
Interacciones de 2 términos	3	0,00834	0,002781	0,06	0,978
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA	3	0,00834	0,002781	0,06	0,978
Error	24	1,04176	0,043407		
Total	31	1,49767			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,208343	30,44%	10,15%	0,00%

## Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,4691	0,0368	12,74	0,000	
LACTOSUERO					
A	-0,0156	0,0368	-0,42	0,675	1,00
CONCENTRACION DE LACTOSA					
0	0,0491	0,0638	0,77	0,449	1,50
1	0,1659	0,0638	2,60	0,016	1,50
5	-0,0766	0,0638	-1,20	0,242	1,50
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA					
A 0	0,0275	0,0638	0,43	0,670	1,50
A 1	-0,0081	0,0638	-0,13	0,900	1,50
A 5	-0,0056	0,0638	-0,09	0,930	1,50

### Ecuación de regresión

RESULTADOS = 0,4691 - 0,0156 LACTOSUERO\_A + 0,0156 LACTOSUERO\_B  
 + 0,0491 CONCENTRACION DE LACTOSA\_0 + 0,1659 CONCENTRACION DE LACTOSA\_1  
 - 0,0766 CONCENTRACION DE LACTOSA\_5 - 0,1384 CONCENTRACION DE LACTOSA\_10  
 + 0,0275 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 0  
 - 0,0081 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 1  
 - 0,0056 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 5  
 - 0,0137 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 10  
 - 0,0275 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 0  
 + 0,0081 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 1  
 + 0,0056 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 5  
 + 0,0137 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 10

### Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	RESULTADOS	Ajuste	Resid	Resid est.
2	0,225	0,611	-0,386	-2,14
<i>Residuo grande R</i>				

### Medias

Término	Media ajustada	Error estándar de la media
LACTOSUERO		
A	0,4534	0,0521
B	0,4847	0,0521
CONCENTRACION DE LACTOSA		
0	0,5181	0,0737
1	0,6350	0,0737
5	0,3925	0,0737
10	0,3306	0,0737
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA		
A 0	0,530	0,104
A 1	0,611	0,104
A 5	0,371	0,104
A 10	0,301	0,104
B 0	0,506	0,104
B 1	0,659	0,104
B 5	0,414	0,104
B 10	0,360	0,104

**Anexo I. Datos arrojados del análisis de varianza para el consumo de lactosa empleando Minitab 18.**

OrdenEst	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	LACTOSUERO	CONCENTRACION DE LACTOSA	RESULTADOS
1	1	1	1	A	0	47,6
2	2	1	1	A	1	65,1
3	3	1	1	A	5	89,6
4	4	1	1	A	10	95,2
5	5	1	1	B	0	38,8
6	6	1	1	B	1	60,4
7	7	1	1	B	5	91,8
8	8	1	1	B	10	97,5
9	9	1	1	A	0	41,8
10	10	1	1	A	1	60
11	11	1	1	A	5	81
12	12	1	1	A	10	94
13	13	1	1	B	0	35,6
14	14	1	1	B	1	58,9
15	15	1	1	B	5	88,1
16	16	1	1	B	10	96
17	17	1	1	A	0	39,2
18	18	1	1	A	1	56,1
19	19	1	1	A	5	84,5
20	20	1	1	A	10	93,5
21	21	1	1	B	0	34,9
22	22	1	1	B	1	44,6
23	23	1	1	B	5	84
24	24	1	1	B	10	95
25	25	1	1	A	0	30,2
26	26	1	1	A	1	39,2
27	27	1	1	A	5	74,9
28	28	1	1	A	10	92,9
29	29	1	1	B	0	30,4
30	30	1	1	B	1	28,6
31	31	1	1	B	5	66,9
32	32	1	1	B	10	87,3

## Regresión factorial general: Resultados vs concentración de lactosa. Información del factor

Factor	Niveles	Valores
LACTOSUERO	2	A. B
CONCENTRACION DE LACTOSA	4	0. 1. 5. 10

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	16821,5	2403,07	32,51	0,000
Lineal	4	16744,6	4186,16	56,63	0,000
LACTOSUERO	1	66,1	66,12	0,89	0,354
CONCENTRACION DE LACTOSA	3	16678,5	5559,50	75,20	0,000
Interacciones de 2 términos	3	76,9	25,62	0,35	0,792
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA	3	76,9	25,62	0,35	0,792
Error	24	1774,2	73,93		
Total	31	18595,7			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
8,59803	90,46%	87,68%	83,04%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	66,36	1,52	43,66	0,000	
LACTOSUERO					
A	1,44	1,52	0,95	0,354	1,00
CONCENTRACION DE LACTOSA					
0	-29,05	2,63	-11,03	0,000	1,50
1	-14,75	2,63	-5,60	0,000	1,50
5	16,24	2,63	6,17	0,000	1,50
LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA					
A 0	0,95	2,63	0,36	0,721	1,50
A 1	2,05	2,63	0,78	0,444	1,50
A 5	-1,54	2,63	-0,58	0,565	1,50

### Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{RESULTADOS} = & 66,36 + 1,44 \text{ LACTOSUERO\_A} - 1,44 \text{ LACTOSUERO\_B} \\
 & - 29,05 \text{ CONCENTRACION DE LACTOSA\_0} - 14,75 \text{ CONCENTRACION DE LACTOSA\_1} \\
 & + 16,24 \text{ CONCENTRACION DE LACTOSA\_5} + 27,56 \text{ CONCENTRACION DE LACTOSA\_10} \\
 & + 0,95 \text{ LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 0} \\
 & + 2,05 \text{ LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 1} \\
 & - 1,54 \text{ LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 5} \\
 & - 1,46 \text{ LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 10} \\
 & - 0,95 \text{ LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 0} \\
 & - 2,05 \text{ LACTOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 1}
 \end{aligned}$$

+ 1,54 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 5  
+ 1,46 LACTOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 10

### Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	RESULTADOS	Ajuste	Resid	Resid est.	
26	39,20	55,10	-15,90	-2,14	R
30	28,60	48,13	-19,52	-2,62	R
31	66,90	82,70	-15,80	-2,12	R
<i>Residuo grande R</i>					



**Anexo J. Datos arrojados del análisis de varianza para la producción de biomasa empleando Minitab 18**

Orden Est	OrdenCorrida	TipoPt	Bloques	LACTOSUERO	CONCENTRACION DE LACTOSA	RESULTADOS
1	1	1	1	A	0	13,8
2	2	1	1	A	1	14,5
3	3	1	1	A	5	15,8
4	4	1	1	A	10	16,8
5	5	1	1	B	0	14
6	6	1	1	B	1	14,6
7	7	1	1	B	5	15,4
8	8	1	1	B	10	16,05
9	9	1	1	A	0	15,7
10	10	1	1	A	1	21
11	11	1	1	A	5	28,9
12	12	1	1	A	10	40,6
13	13	1	1	B	0	20,6
14	14	1	1	B	1	24,8
15	15	1	1	B	5	32,8
16	16	1	1	B	10	33,7
17	17	1	1	A	0	23
18	18	1	1	A	1	33,9
19	19	1	1	A	5	65,84
20	20	1	1	A	10	80,7
21	21	1	1	B	0	22,4
22	22	1	1	B	1	30,7
23	23	1	1	B	5	48
24	24	1	1	B	10	54
25	25	1	1	A	0	29,9
26	26	1	1	A	1	38,52
27	27	1	1	A	5	72,12
28	28	1	1	A	10	107,74
29	29	1	1	B	0	25,58
30	30	1	1	B	1	34,82
31	31	1	1	B	5	69,56
32	32	1	1	B	10	69,48

## Regresión factorial general: Resultados vs. Concentración de lactosa. Información del factor

Factor	Niveles	Valores
LACOSUERO	2	A. B
CONCENTRACION DE LACTOSA	4	0. 1. 5. 10

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	5896,1	842,3	1,79	0,135
Lineal	4	5466,6	1366,7	2,91	0,043
LACOSUERO	1	266,4	266,4	0,57	0,459
CONCENTRACION DE LACTOSA	3	5200,2	1733,4	3,69	0,026
Interacciones de 2 términos	3	429,5	143,2	0,30	0,822
LACOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA	3	429,5	143,2	0,30	0,822
Error	24	11280,4	470,0		
Total	31	17176,5			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
21,6799	34,33%	15,17%	0,00%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	35,79	3,83	9,34	0,000	
LACOSUERO					
A	2,89	3,83	0,75	0,459	1,00
CONCENTRACION DE LACTOSA					
0	-15,17	6,64	-2,29	0,031	1,50
1	-9,19	6,64	-1,38	0,179	1,50
5	7,76	6,64	1,17	0,254	1,50
LACOSUERO*CONCENTRACION DE LACTOSA					
A 0	-2,91	6,64	-0,44	0,665	1,50
A 1	-2,51	6,64	-0,38	0,709	1,50
A 5	-0,77	6,64	-0,12	0,908	1,50

### Ecuación de regresión

RESULTADOS = 35,79 + 2,89 LACOSUERO\_A - 2,89 LACOSUERO\_B - 15,17 CONCENTRACION DE LACTOSA\_0  
 - 9,19 CONCENTRACION DE LACTOSA\_1 + 7,76 CONCENTRACION DE LACTOSA\_5  
 + 16,59 CONCENTRACION DE LACTOSA\_10 - 2,91 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A  
 0 - 2,51 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 1  
 - 0,77 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 5  
 + 6,19 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_A 10  
 + 2,91 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 0  
 + 2,51 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 1  
 + 0,77 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 5

- 6,19 LACOSUERO\*CONCENTRACION DE LACTOSA\_B 10

### Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	RESULTADOS	Ajuste	Resid	Resid est.	
4	16,8	61,5	-44,7	-2,38	R
28	107,7	61,5	46,3	2,46	R
<i>Residuo grande R</i>					

**Anexo I. Resultados obtenidos de la estimación de los parámetros cinéticos en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero empleando *L. casei***

Lactosuero	dx	ds	dx/ds	dp	dp/ds	dp/dx
LDT	11,58	8,40	1,38	3,95	0,47	0,34
LDC1	20,22	31,80	0,64	6,85	0,22	0,34
LDC2	32,60	24,90	1,31	2,85	0,11	0,087
LDC3	53,43	10,20	5,24	0,90	0,090	0,017
LET	16,10	17,40	0,93	3,30	0,19	0,20
LEC1	24,02	25,90	0,93	6,05	0,23	0,25
LEC2	56,32	14,70	3,83	1,75	0,12	0,03
LEC3	90,44	2,30	39,54	1,05	0,46	0,012

dx : diferencial de concentración de biomasa expresada como peso seco

ds: diferencial de la concentración de sustrato consumido( lactosa)

dp: diferencial de la concentración de producto formado( ácido láctico)