

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS

**“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE FERMENTACIÓN DEL
SUERO DE LA LECHE PARA LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO
CON LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTAS”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO**

CARMEN, WARTHON AYALA

MERCEDES ZORAIDA, RAMOS HUAMAN

Callao, Junio, 2019

PERÙ

DEDICATORIA

Agradecemos a nuestros padres porque gracias a ellos hemos podido iniciar este camino largo, pero también satisfactorio

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios, a nuestros padres por permitirnos haber logrado este proyecto, a la Universidad Nacional del Callao por la acogida durante nuestra vida universitaria, a la Facultad de Ingeniería Química por ser el pilar de nuestra formación como ingeniera, a la Dra. Sonia Herrera Sánchez por asesorarnos en el proyecto, al Q.F Walter Tapia Chacaltana por su apoyo en la parte experimental del proyecto, a nuestro jurado evaluador por su revisión exhaustiva del proyecto y a cada uno de los profesores que contribuyeron día a día, con sus conocimientos y experiencia en nuestro desarrollo profesional.

También agradecemos de manera muy especial al Ing. Julio Cesar Calderón de la Cruz, por la asesoría brindada en el proyecto de investigación, a la Ing. Mabel Luna Chávez por la ayuda brindada y facilidades para el uso del laboratorio de investigación especializada en alimentos.

Y por último agradecer a los ganaderos de la provincia de cantá por la donación del suero de la leche.

INDICE

TABLAS DE CONTENIDO.....	5
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION.....	10
1.1 Identificación del problema.....	10
1.2 Formulación del problema.....	11
1.2.1 Problema General.....	11
1.2.2 Problemas Específicos.....	12
1.3 Objetivos de la investigación.....	12
1.3.1 Objetivo General.....	12
1.3.2 Objetivos Específicos.....	12
1.4 Justificación.....	13
1.4.1 Justificación Tecnológica.....	14
1.4.2 Justificación Económica.....	14
1.5 Importancia.....	14
II. MARCO TEORICO.....	16
2.1 Antecedentes de estudio.....	16
2.2 Suero de la leche.....	19
2.3 Fermentación láctica.....	20
2.4 Crecimiento microbiano.....	22
2.5 Microorganismos utilizados para la fermentación láctica.....	23

2.5.1	Bacterias lácticas.....	24
2.6	Ácido Láctico.....	29
2.7	Optimización por superficie de respuestas.....	31
2.7.1	Diseño de Box-Behnken.....	33
2.8	Definiciones básicas.....	34
III.	VARIABLES E HIPOTESIS.....	36
3.1	Variables de investigación.....	36
3.1.1	Niveles de variación de los parámetros operacionales.....	37
3.2	Operacionalización de variables.....	38
3.3	Hipótesis.....	39
3.3.1	Hipótesis general.....	39
3.3.2	Hipótesis específicas.....	39
IV.	METODOLOGÍA.....	40
4.1	Tipo de investigación.....	40
4.2	Diseño de la investigación.....	41
4.2.1	Diseño experimental.....	41
4.2.2	Etapas de investigación.....	43
4.3	Población y Muestra.....	45
4.4	Técnicas e instrumentación de recolección de datos...	46
4.4.1	Equipos, Materiales, Reactivos y Métodos.....	48
4.5	Procesamiento de recolección de datos.....	50

4.5.1	Primera etapa de investigación: Acondicionamiento del suero de la leche.....	52
4.5.2	Segunda etapa de investigación: Caracterización del suero de la leche.....	54
4.5.3	Tercera etapa de investigación: Parámetros operacionales.....	58
4.5.4	Cuarta etapa de investigación.....	62
4.6	Procesamiento estadístico y análisis de datos.....	65
4.6.1	Tratamiento estadístico.....	65
4.6.2	Análisis estadístico.....	65
V.	RESULTADOS.....	67
5.1	Acondicionamiento de la materia prima y del medio...	67
5.2	Crecimiento microbiano.....	68
5.3	Fermentación.....	71
5.4	Caracterización del ácido láctico.....	73
5.4.1	Reconocimiento del ácido láctico.....	73
5.4.2	Concentración del ácido láctico.....	76
5.4.3	Lecturas de las muestras.....	77
5.5	Optimización del proceso.....	78
5.5.1	Análisis del diseño de superficie de respuestas.....	79
5.5.2	Resultado de la optimización.....	81
5.6	Validación del modelo.....	82

VI.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	83
6.1	Contrastación de la hipótesis con resultados.....	83
6.2	Contrastación de resultados con otros estudios similares.....	84
VII.	CONCLUSIONES.....	88
VIII.	RECOMENDACIONES.....	89
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	90
X.	ANEXOS.....	97
10.1	Matriz de consistencia.....	97
10.2	Folleto de la cepa.....	98
10.3	Tabla de conversión de lactosa.....	100
10.4	Procesos unitarios y Parte experimental.....	103

TABLAS DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Fermentación láctica homofermentativa.....	21
2.2 Fermentación láctica heterofermentativa.....	21
2.3 Estructura del ácido láctico.....	30
2.4 Gráfica de superficie de respuesta.....	32
3.1 Diagrama de variables.....	36
4.1 Etapas de la investigación.....	44
4.2 Representación del procedimiento experimental.....	51
5.1 Espectro del ácido láctico patrón.....	73
5.2 Muestra 1 leído en el espectrómetro infrarrojo FTIR.....	74
5.3 Muestra 2 leído en el espectrómetro infrarrojo FTIR.....	74
5.4 Muestra 3 leído en el espectrómetro infrarrojo FTIR.....	75
5.5 Muestra 4 leído en el espectrómetro infrarrojo FTIR.....	75
5.6 Análisis de varianza.....	79
5.7 Resumen del modelo.....	80
5.8 Análisis de la optimización de la respuesta.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

2.1 Composición de lactosuero dulce y ácido.....	19
2.2 Propiedades del ácido láctico.....	31
3.1 Niveles de variación de los parámetros operacionales.....	37
3.2 Variables de investigación.....	38
4.1 Explicación de variables.....	40
4.2 Plan de experimentación de la fermentación.....	42
4.3 Datos de los residuos lácticos por lechería.....	45
5.1 Características del suero de la leche.....	67
5.2 Tabla de crecimiento celular A.....	68
5.3 Tabla de crecimiento celular B.....	69
5.4 Tabla de crecimiento celular C.....	70
5.5 Control de fermentación.....	72
5.6 Determinación de la curva de calibración.....	76
5.7 Determinación de la concentración del ácido láctico.....	77
5.8 Variables operacionales y respuestas.....	78
6.1 Comparación de resultados con los antecedentes.....	86

ÍNDICE DE GRAFICOS

2.1 Curva de crecimiento celular.....	23
5.1 Curva de crecimiento celular A.....	69
5.2 Curva de crecimiento celular B.....	70
5.3 Curva de crecimiento celular C.....	71
5.4 Curva patrón del ácido láctico.....	76
5.5 Gráfica de Superficie.....	81
5.6 Gráfica de Optimización.....	82

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar los parámetros óptimos de la temperatura, la concentración del inóculo y el pH para la fermentación del suero de la leche utilizando las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*; mediante el diseño Box-Behnken de la metodología de superficie de respuesta.

Se acondicionó el suero de la leche, lo cual consistió en la desproteinización, la pre-filtración y la filtración en esta última etapa se busca el número de malla óptimo resultando estas partículas menores a 155 μm ., después de ello se realizó la caracterización del suero de la leche obteniéndose 4,8 % de lactosa, 0,5 % de proteínas y 6,0 de pH y para la fermentación usamos los datos que genera el diseño Box-Behnken el cual trabaja con 3 factores y 3 niveles en cada factor en base a ello generó 30 experimentos, cuando ya se tiene los resultados de los experimentos el diseño se encarga de construir una ecuación de superficie de respuesta donde se modela los cambios en las variables y cómo éstas afectan en la respuesta, finalmente el diseño determinó los parámetros óptimos de 42 °C de temperatura, 0,1 g/L de inóculo y 6,0 de pH; donde se obtuvo 41,4979 g/L de ácido láctico.

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the optimal parameters of temperature, inoculum concentration and pH for the fermentation of milk whey using the bacteria *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*; through the Box-Behnken design of the response surface methodology.

Milk whey was conditioned, which consisted of deproteinization, prefiltration and filtration. In this last stage, the optimum mesh number was found, resulting in particles smaller than 155µm, after which the characterization of the serum was carried out. of milk, obtaining 4.8% of lactose, 0.5% of proteins and 6.0 of pH and for fermentation we use the data generated by the Box-Behnken design, which works with 3 factors and 3 levels in each factor. Based on this, it generated 30 experiments. Once the results of the experiments are available, the design is responsible for constructing an equation. response surface where the changes in the variables are modeled and how they are affected in the response, finally the design determined the optimal parameters of 42 ° C of temperature, 0.1 g / L of inoculum and 6.0 of pH; where 41.4979 g / L of lactic acid was obtained.

I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación del problema

Durante la última década ha habido una creciente presión social, ambiental y empresarial (menor costo) para desarrollar métodos alternativos a la síntesis química que produce la gran mayoría de compuestos orgánicos del mundo, para lo cual ya se han evaluado alternativas biotecnológicas para la síntesis de los ácidos orgánicos.

Por motivos ambientales se ha visto conveniente la utilización de un residuo de la elaboración de quesos, el suero de la leche, como una alternativa para la producción de ácido láctico ya que este no es aprovechado y se vierten en los efluentes contribuyendo con el aumento de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) en las aguas residuales.

Este aumento del DBO_5 en las aguas residuales provoca que afecte el ecosistema acuático, ya que a mayor DBO_5 aumenta el consumo de oxígeno disuelto en agua. También los sólidos suspendidos totales del suero causan un gran daño al ecosistema acuático ya que se depositan en el fondo del cuerpo del agua evitando la transferencia de

oxígeno. La ventaja de usar microorganismos para la producción industrial o combinar su uso con procesos químicos de síntesis, es principalmente la habilidad de sintetizar enantiómeros específicos, por su crecimiento a gran escala y la separación fácil de productos y sustratos, además, la gran diversidad metabólica permite su aplicación como productos de metabolitos primarios y secundarios.

Debido a que el ácido láctico actualmente está en una demanda creciente fue necesario buscar otros procesos de obtención o reestudiar los ya existentes, es por ello que en este trabajo se optimizó el proceso de obtención mediante el uso de microorganismos, haciendo cambios en sus parámetros de operación, es decir la temperatura y la concentración del inóculo, obteniendo un mayor rendimiento de producción.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cómo optimizar el proceso de fermentación del suero de la leche para la obtención de ácido láctico?

1.2.2 Problemas específicos

- a. ¿Cómo acondicionar la materia prima y en que beneficia ello al crecimiento microbiano?

- b. ¿Cómo determinar los parámetros operacionales óptimos (Temperatura, concentración de inóculo Y pH) para la obtención del ácido láctico a partir del suero de la leche?

- c. ¿Cuál será el rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Optimizar los parámetros de fermentación del suero de la leche para la obtención de ácido láctico

1.3.2 Objetivos específicos

- a. Encontrar el acondicionamiento adecuado de la materia prima y el medio para el crecimiento microbiano.

- b. Determinar los parámetros operacionales óptimos (Temperatura, concentración del inóculo y pH) para la obtención de ácido láctico a partir del suero de la leche.

- c. Determinar cuál será el rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico

1.4 Justificación

El ácido láctico debido a su naturaleza orgánica está presente en muchas industrias como por ejemplo la industria alimentaria donde se usa como acidulante y preservante, la industria química donde 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 (PLA), un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y en la medicina, es por ello que buscaremos la optimización de los parámetros de la fermentación para así tener una mayor conversión de la lactosa.

1.4.1 Justificación tecnológica

El estudio de la obtención del ácido láctico mediante la fermentación del suero de la leche, es un gran aporte a nivel tecnológico debido a que la demanda del ácido láctico actualmente va en aumento y se debe a su nueva aplicación en la industria de plásticos biodegradables y es por ello los esfuerzos en la investigación del ácido láctico para desarrollar nuevas tecnologías de fermentación y separación alcanzando así altos rendimientos y altas productividades.

1.4.2 Justificación económica

Debido al aumento considerable de la demanda del ácido láctico también ha aumentado su costo de producción, Es por ello que vemos favorable optimizar su proceso de obtención del ácido láctico, obteniendo así por un mismo costo mayor cantidad de ácido láctico.

1.5 Importancia

Esta investigación es importante dado que la materia prima son efluentes lácticos los cuales de no ser usados la única función que

cumplen es la contaminación, muy aparte de ello la optimización de los parámetros de la fermentación nos permitió obtener una mayor cantidad de ácido láctico, el cual como ya es de nuestro conocimiento es materia prima principal en la producción de plásticos biodegradables, lo cual a futuro evita la contaminación ambiental, también interviene en la industria alimentaria como preservantes, en la industria química como solubilizador y agente controlador de pH, en la industria de pinturas y resinas como solvente biodegradable.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudio

Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando lactobacillus delbrueckii subespecie. Bulgaricus y Streptococcus thermophilus.

En esta investigación se determinó las condiciones adecuadas de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para la producción de ácido láctico, utilizando como sustrato el lactosuero. El ácido láctico fue producto de la extracción y purificación de caldos de fermentación donde se usa como bacterias fermentativas el co-cultivo *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, usualmente usadas para la producción de yogurt. El sustrato fue suplementado con extracto de levadura, fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y carbonato de calcio como neutralizante. Esto para poder optimizar el consumo, por parte de las bacterias del carbohidrato principal presente en el suero (lactosa). Durante la fermentación se controló la concentración del inóculo y temperatura, el tiempo máximo fue 72 h. La purificación se llevó a cabo mediante esterificación, filtración de sólidos formados con la reacción y extracción de agua por

evaporación y posterior arrastre con nitrógeno. Finalmente se obtuvo ácido láctico con un 78,0% de pureza (36,7 g/L), el cual se caracterizó a través de espectroscopia infrarroja. El aporte de esta investigación fue los suplementos del suero de leche que establecieron y el tiempo de la fermentación. (Rojas, 2015)

Obtención de ácidos orgánicos por fermentación de subproductos lácteos

En esta investigación el proceso fermentativo se realizó con la bacteria láctica *Lactobacillus casei* buscándose conocer su comportamiento fermentativo en una matriz natural y compleja basada en una mezcla de azúcares fermentables, estableciendo las condiciones operacionales más adecuadas. En esta investigación se caracterizó y monitoreó los diferentes estados fisiológicos del *Lactobacillus casei* durante la producción fermentativa del ácido láctico. Teniéndose como resultados que el suero lácteo de yogurt es una fuente adecuada para la producción de ácido láctico por medio fermentativo a partir del *Lactobacillus casei* a partir de una materia prima hasta ahora considerada como un residuo y que se caracteriza por presentar altos niveles de azúcares fermentables sin la necesidad de realizar un pre tratamiento alguno. Esta investigación dio el soporte

a la viabilidad de la materia prima para la obtención del ácido láctico (Tuero, 2013)

Diseño de procesos en Industria Láctea: Transformación de lactosuero.

En esta investigación se trata sobre las características del lactosuero siendo una de ellas su riqueza en lactosa la principal responsable del mismo, debido a su capacidad para actuar como sustrato de fermentación microbiana, como también ven el efecto de este si fuese vertido, debido a que la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) del suero lácteo varía entre 20.000 y 50.000 mg de O₂/L. En otras palabras, cerca de 0,25 a 0,30 litros de suero sin depurar, equivalen a las aguas negras producidas en un día por una persona.

El lactosuero tiene alto poder contaminante, por lo tanto, no debe ser desechado, sino utilizado. Éste es una fuente rica en nutrientes. No utilizarlo es el peor error que se puede cometer en la industria láctea.

El lactosuero puede ser aprovechado de diversas maneras; todo está en la imaginación del investigador. Esta investigación aportó en la importancia y las propiedades de la materia prima. (Ramírez, 2013).

2.2 Suero de la leche

El suero de la leche o también llamado lactosuero es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegedin y Luck, 2002), otra definición del suero de la leche es que es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína. (Jelen, 2003).

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.

TABLA N° 2.1

COMPOSICIÓN DE LACTOSUERO DULCE Y ÁCIDO

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63,0 - 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa	46,0 - 52,0	44,0 – 46,0
Proteína	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfatos	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Lactato	2,0	6,4
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 (Liu et al., 2005). 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). (Panesar, 2007).

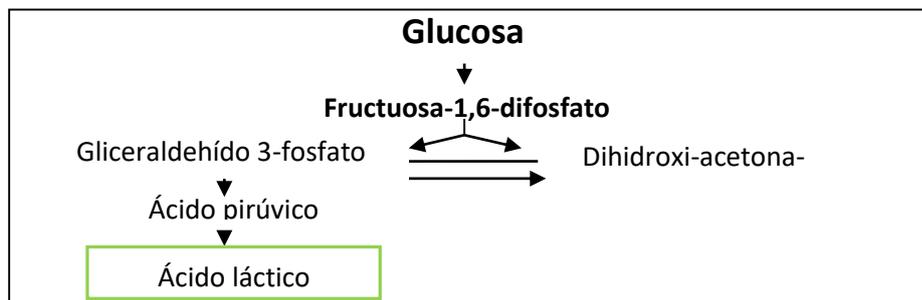
2.3 Fermentación Láctica

La fermentación láctica es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. Este proceso lo realizan las bacterias ácido lácticas (BAL), algunos hongos, algunos protozoos y en los tejidos animales.

Las BAL son un grupo de bacterias gram positivas que fermentan hidratos de carbono convirtiéndolos en ácido láctico casi en su totalidad (homofermentativa) o a una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético y/o etanol (heterofermentativo), otros compuestos tales como diacetilo, acetaldehído y peróxido de hidrógeno, también se producen. (Véase las figuras N° 2.1 y 2.2, en la página 21) (Rahman, 2011).

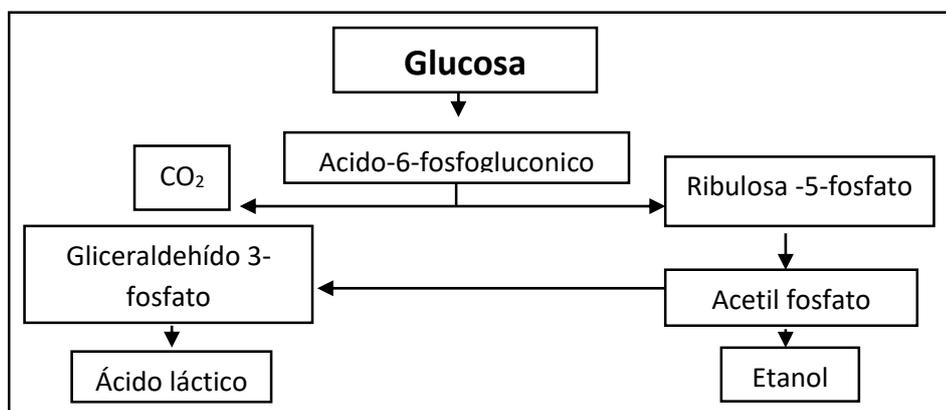
Por otra parte la producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización 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. (Hofvendahl y Hagerdal, 2000).

FIGURA N° 2.1
FERMENTACIÓN LÁCTICA HOMOFERMENTATIVA



Fuente: C.Lanpent (1995)

FIGURA N° 2.2
FERMENTACIÓN LÁCTICA HETEROFERMENTATIVA



Fuente: C.Lanpent (1995)

2.4 Crecimiento microbiano

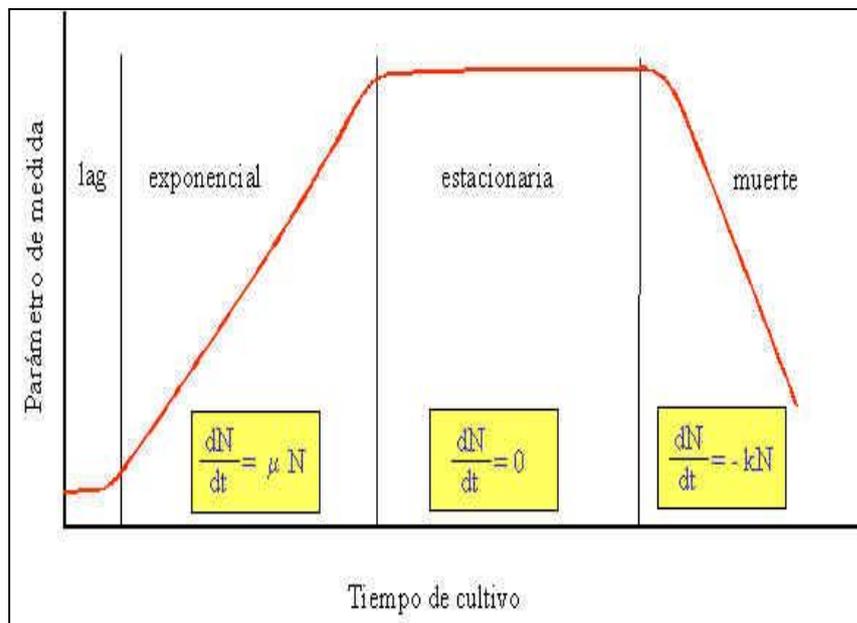
Existen varias fases del crecimiento celular. (Véase la gráfica N° 2.1, en la página 23) donde se observa una típica curva de crecimiento celular. Las diferentes fases de crecimiento celular se distinguen más fácilmente cuando se representa el logaritmo neperiano de la concentración de células viables frente al tiempo. La velocidad de crecimiento depende de la fase de crecimiento. Durante la fase de adaptación o latencia inmediatamente después de la inoculación, la velocidad de crecimiento es prácticamente cero. (Doran, 1998)

Las células utilizan esta fase para adaptarse al nuevo ambiente, y algunas veces sintetiza nuevas enzimas o componentes estructurales. Tras este periodo de adaptación, comienza el crecimiento en la fase de aceleración y continúa durante la fase de crecimiento propiamente dicha y durante la fase de deceleración. Si el crecimiento es exponencial, la fase de crecimiento aparece como una línea recta en una representación semilogarítmico por lo que a veces se denomina fase logarítmica. Cuando los nutrientes en el medio de cultivo se ha consumido o se acumula los productos inhibidores, el crecimiento disminuye y las células comienzan en la fase de deceleración. Tras este periodo de transición se alcanza la fase estacionaria en la que no se produce crecimiento. Algunos

cultivos presentan una fase de muerte cuando las células pierden vitalidad o son destruidas por ruptura.

GRAFICO Nº 2.1

CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR



Fuente: Bob Freeman (1986)

2.5 Microorganismo utilizados para fermentación láctica

En la utilización de bacterias para la producción por fermentación, se busca que estas sean preferiblemente termófilas, que fermenten rápida y completamente sustratos baratos, con adición mínima de nutrientes nitrogenados, que crezcan en condiciones de valores

reducidos de pH, que presentan poca producción de biomasa y una despreciable cantidad de subproductos. (Akerberg, 1998)

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, Leuconostoc, Tetragenococcus, lactococcus ,Vagococcus, Enterococcus, Aerococcus y Weissella. (Hofvendahl y Hagerdal, 2000)

2.5.1 Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son Gram positivas, ácido tolerantes, algunos en rangos de pH entre 4.8 y 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos. Son organismos que no forman esporas, son inmóviles, cocos o bacilos con bajo contenido de guanina y citocina, y asociados todos por sus características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas son bacterias que generalmente se encuentran en plantas y productos lácteos en descomposición produciendo ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. Esta particularidad ha enlazado,

históricamente, a las BAL con la producción de alimentos fermentados, pues la acidificación que producen inhibe el crecimiento de agentes que causan descomposición. Más aún, algunas BAL son productoras de bacterocinas tóxicas, proveyendo un obstáculo adicional para los microorganismos patogénicos. (Rosibel, 2013)

Los géneros básicos que comprenden las BAL son Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactococcus, y Streptococcus así como los Lactobacillales, Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Teragenococcus, Vagococcus, y Weisella. Los medios de cultivo para bacterias lácticas típicamente incluyen fuentes de carbohidratos, siendo que la mayoría de estas especies son incapaces de aprovechar la respiración celular.

Existen dos vías básicas de fermentación de hexosas que son usados para la clasificación de los géneros de BAL. En condiciones de exceso de glucosa y un limitado uso de oxígeno, las BAL homolácticos transforman un mol de glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para formar dos moles de piruvato. El balance redox intracelular se mantiene por la oxidación de NADH con la concomitante reducción del

piruvato en ácido láctico. Este proceso genera dos moles de ATP por cada mol de glucosa consumida. Los representantes de las BAL homolácticas incluyen *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y el grupo I *Lactobacilli*. (Véase en la figura 2.1, en la página 23)

Las BAL heterofermentativas utilizan la ruta de la pentosa fosfato, en la que un mol de glucosa-6-fosfato es inicialmente deshidrogenada a 6-fosfogluconato y luego descarboxilada para producir un mol de CO₂. El resultante pentosa-5-fosfato es disociado en un mol de fosfato de gliceraldehído y un mol de acetilfosfato. El fosfato de gliceraldehído se metaboliza luego en ácido láctico, tal como en la reacción de los homofermentadores, con el acetilfosfato reduciéndose a etanol vía los intermediarios acetil-CoA y acetaldehído.

Teóricamente, los productos finales (incluyendo el ATP) son producidos en cantidades equimolares a partir del catabolismo de un mol de glucosa. Las BAL obligatoriamente heterofermentativas incluyen: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, y el grupo III *Lactobacilli*. (Véase en la figura 2.2, en la página 21)

De las bacterias lácticas antes mencionadas se escogerán dos de ellas para la producción de ácido láctico y estas son el *Lactobacillus Bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus* ya que estas dos bacterias realizan una simbiosis en la cual se dará un ambiente favorable para la producción de ácido láctico ya que al inicio de la fermentación el *Streptococcus thermophilus* da las condiciones favorables de producción de CO₂ y ácido fórmico para el crecimiento del *Lactobacillus Bulgaricus*. Esta cooperación que realizan estas dos bacterias nos dan tiempos de fermentación más rápidos.

a) *Lactobacillus bulgaricus*

Esta especie bacteriana pertenece a la familia taxonómica *Lactobacillaceae*, del orden *Lactobacillales*, dentro de la clase *Bacilli* del Reino *Bacteria*. El género *Lactobacillus* recibe su nombre de la capacidad de muchos de los miembros del género para metabolizar la lactosa, entre otros azúcares, y obtener ácido láctico. De los más de cien integrantes del género muchos de ellos son empleados para procesar la leche para obtener yogures, quesos y otros productos derivados. Esta bacteria es un bacilo GRAM positivo, que reaccionan negativamente a la prueba de catalasa. En

ocasiones puede crecer formando filamentos, por lo que no tiene flagelos ni cilios. Este hecho hace que se le considere una bacteria no móvil. Como ya hemos comentado es capaz de fermentar la lactosa, un disacárido formado por una glucosa y una galactosa, obteniendo ácido láctico. Para la fermentación necesita unas condiciones anoxigénicas, aunque la bacteria es tolerante al oxígeno. Como el resto de bacterias cuyo metabolismo elimina algún ácido, *Lactobacillus Bulgaricus* elimina ácido láctico, el pH al que está acostumbrado a vivir es ligeramente ácido, entre 4 y 5 (es esta bajada de pH la que provoca que coagulen las proteínas de la leche). Esta especie de *Lactobacillus* forma parte de la flora intestinal de muchos animales y rara vez se asocia con algún proceso patogénico. (Accolas, 2000)

b) *Streptococcus thermophilus*

Es una bacteria homofermentativa. En la leche producen 0,7 – 0,8 % de ácido láctico L (+), en algunas cepas son capaces de producir hasta un porcentaje de ácido láctico. En la leche, además de producir ácido láctico, produce los ácidos grasos volátiles, fórmico, acético, propiónico, butírico, isovaleico y capriónico, además produce acetona y pequeñas cantidades de

acetaldehído. Presenta una actividad proteolítica muy pequeña en la leche y la mayoría de aminoácidos liberados son consumidos durante la fase de crecimiento logarítmico. Es una bacteria termófila en la cual su temperatura de crecimiento está entre 10-50 °C siendo la máxima y mínima respectivamente. También es una bacteria termodúrica, aguanta un tratamiento de calor en la leche de 30 minutos a 60°C. Estas bacterias crecen en un pH ligeramente ácido entre 4-6 donde en el cual estas pueden adaptarse y sintetizar su alimento. Esta bacteria es muy sensible a la presencia de inhibidores y en especial de antibióticos, por ejemplo a la penicilina y también es muy sensible a la sal, hecho que aprovecha para diferenciarlo de otros lactococos y enterococos, no crece en presencia de un 4% de sal y algunas cepas en presencia de un 2% de sal. (Romero, 2004).

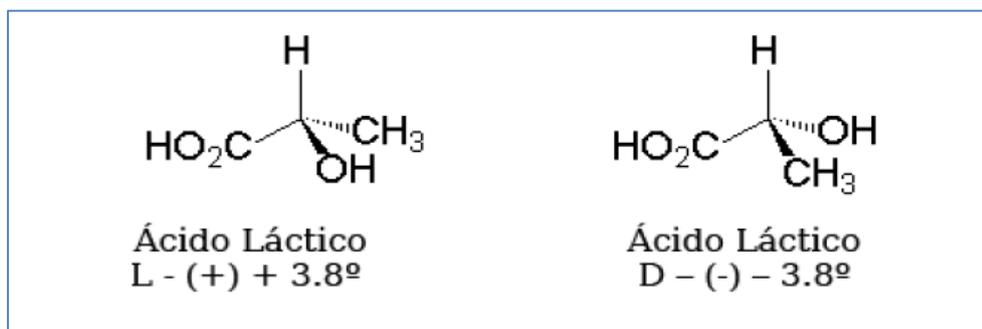
2.6 Ácido Láctico

El ácido láctico se denomina ácido 2-hidroxiopropanoico y está formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, conformando un carbono asimétrico que le confiere su actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D(-) láctico y el L(+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). El

isómero D(-) es perjudicial al metabolismo humano y puede generar acidosis y descalcificación. En la figura 2.3 se muestra la estructura química del ácido láctico (isómero D y L).

FIGURA N° 2.3

Estructura del ácido láctico D (-) y ácido láctico L (+)



Fuente: *Del Angel (2007)*

El ácido L(+) láctico es clasificado por la **Food and Drug Administration** (FDA) como una sustancia **Generally recognized as safe (GRAS)**, generalmente reconocido como seguro para uso como aditivo alimenticio. Tanto las dos formas ópticamente activas como la racémica se encuentran en formas líquidas, incoloras y solubles en el agua. En estado puro son sólidos altamente higroscópicos de punto de fusión bajo. Las formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y producidas con diferentes propiedades. Los isómeros puros del ácido láctico pueden ser obtenidos por fermentación microbiana a partir de una fuente renovable. 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 tabla 2.2 se muestran las propiedades físico-químicas del ácido láctico.(García, 2013).

TABLA N° 2.2
PROPIEDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08 kg/mol
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	L (+) y D (-): 52,8 a 54°C. DL (según composición): 16,8 a 33°C
Punto de ebullición	125 -140 °C
Calor de combustión	3,616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm ⁻²
Densidad	1,249 kg/m ³
Constante dieléctrica	22ε

Fuente: Gil, Fuente: Domínguez & pachó (2008).

2.7 Optimización por Superficie de Respuestas

Un diseño de superficie de respuestas es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que facilitan la determinación

de las variables que influyen la respuesta de interés. Una vez que dichas variables son identificadas, se obtiene una estimación aproximada de la superficie de respuesta por medio de modelos factoriales especiales. Esta superficie de respuesta se usa como guía para variar gradualmente los factores controlables que afectan a la respuesta de manera tal que se mejore el valor de la respuesta. Una vez que el cambio de los factores controlables no origine una mejora predecible en la variable de la respuesta, se puede aplicar un método de experimentación más sofisticado para encontrar la superficie de respuesta operativa final del proceso de interés, para lo cual se puede utilizar diseño de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta. Ver figura 2.4.

FIGURA 2.4

GRAFICA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA



Fuente: *Elaboración Propia*

La superficie de respuesta tiene dos metodologías las cuales son el diseño centrado compuesto y Box-Behnken, la cual se utilizara en el presente trabajo.

2.7.1 Diseño de Box-Behnken

El diseño de Box- Behnken es un tipo de diseño de respuesta que no tiene un diseño factorial o factorial fraccionado incrustado. Este diseño requiere como mínimo tres factores y trabaja con 3 niveles, los cuales se sitúan en combinaciones de los niveles altos y bajos de los factores y sus puntos medios.

El diseño Box – Behnken permite una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden, también suelen tener menos puntos de diseño por lo cual pueden ser menos costosos de realizar que los diseños centrales compuestos con el mismo número de factores. Sin embargo, debido a que estos diseños no tienen un diseño factorial incrustado, no son adecuados para experimentos secuenciales, además este diseño nunca incluye corridas donde todos los factores estén en su valor extremo, como por ejemplo todos los valores de configuración bajos.

2.8 Definiciones básicas

➤ **Anaerobios**

Son los organismos que no utilizan oxígeno (O₂) en su metabolismo, más exactamente que el acepto final de electrones es otra sustancia diferente del oxígeno anacrónica anacrónica.

➤ **Bacterias Gram positivos**

La envoltura de estas bacterias comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea la interior, además estas bacterias se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram,

➤ **Bacterias Gram negativas**

Estas bacterias tienen como envoltura celular una doble membrana (una externa y otra citoplasmática) entre las cuales se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, además estas no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, lo hacen de un color rosado tenue.

➤ **Biomasa**

Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

➤ **Cultivo**

Es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado.

➤ **Microorganismo**

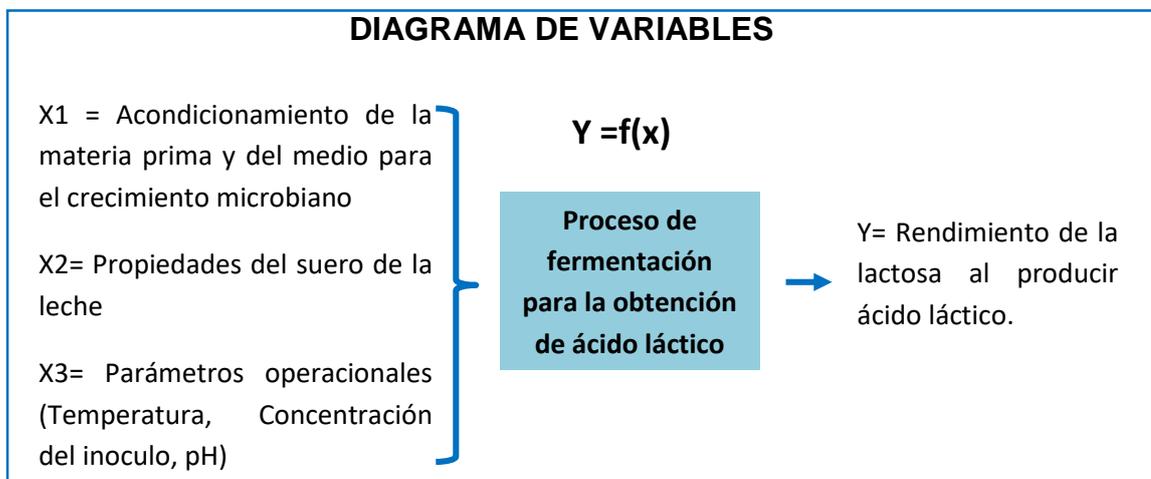
Es un ser vivo, o un sistema biológico, que solo puede visualizarse con el microscopio.

III. VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1 Variables de investigación

- Acondicionamiento de la materia prima y del medio para el crecimiento microbiano
- Propiedades del suero de la leche (cantidad de lactosa, cantidad de proteínas y pH).
- Parámetros operacionales (Temperatura, Concentración del inóculo y pH).
- Rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico.

FIGURA N° 3.1



Fuente: *Elaboración propia*

3.1.1 Niveles de variación de los parámetros operacionales

Las pruebas experimentales de la fermentación están basadas en tres niveles de variación de cada una de las variables independientes que se detallan en la siguiente tabla:

TABLA N° 3.1
NIVELES DE VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES

FACTORES	NIVEL 1			NIVEL 2			NIVEL 3		
	símbolo	indicador	justificación	símbolo	indicador	justificación	símbolo	indicador	Justificación
1. Temperatura (°C)	T ₁	40	T mínima donde crece la cepa	T ₂	41	T intermedia	T ₃	42	T adecuada donde crece la cepa
2. Concentración del inóculo (g/L)	C ₁	0,1	C donde hay crecimiento	C ₂	0,15	C intermedia	C ₃	0,2	C máxima donde habrá crecimiento
3. pH	pH ₁	6,0	pH donde hay crecimiento	pH ₂	5,5	pH intermedia	pH ₃	5,0	pH máxima donde habrá crecimiento

Fuente: *Elaboración Propia*

3.2 Operacionalización de variables

TABLA N° 3.2

VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

Variable dependiente	Dimensiones	Indicadores	Método
Y= Rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico.	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración 	<ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrofotometría UV
Variable independiente	Dimensiones	Indicadores	Método
X1= Acondicionamiento de la materia prima y del medio para el crecimiento microbiano	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas en suspensión 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño de malla 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración
X2= Propiedades del suero de la leche	<ul style="list-style-type: none"> • Acidez • Cantidad de proteínas • Cantidad de lactosa 	<ul style="list-style-type: none"> • pH • g/mL • g/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • Potenciómetro • Método kjeldahl • Método NMX-219-1979
X3= Parámetros operacionales (Temperatura, Concentración del inóculo, pH)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura • Concentración de inóculo • Acidez 	<ul style="list-style-type: none"> • °C • g/mL • pH 	<ul style="list-style-type: none"> • Termómetro • Dilución de soluciones • Potenciómetro

Fuente: Elaboración propia

3.3 Hipótesis

3.3.1 Hipótesis general

La fermentación del suero de la leche, utilizando como inóculo el *Lactobacillus Bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus* a una temperatura de 41 °C, a una concentración de inóculo de 0,2 g/L y un pH de 5.5 se logrará obtener una conversión del 30% de lactosa a ácido láctico .

3.3.2 Hipótesis específicas

- a. Mediante la desproteinización y filtración de la materia prima se logrará mejorar la producción de ácido láctico y con el porcentaje de proteínas menores a 0,6 % del suero de la leche se logrará obtener un mejor medio para el crecimiento bacteriano.
- b. A una temperatura de 41°C, concentración de inóculo de 0,2 g/L y pH de 5,5 se logrará una mayor conversión de lactosa en ácido láctico.
- c. Mediante la optimización del proceso se logrará un 30 % de conversión de lactosa a ácido láctico.

IV. METODOLOGIA

4.1 Tipo de investigación

Nuestro proyecto se basa a un tipo de investigación básica debido a que tiene como finalidad generar mayores aportes acerca del proceso de obtención del ácido láctico mediante el proceso de fermentación; y es de carácter exploratorio por lo cual es experimental. Por el análisis de las variables, véase en la tabla 4.1.

TABLA Nº 4.1
EXPLICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	EXPLICACIÓN
Optimización del proceso de fermentación del suero de la leche.	Esta variable es cuantitativa debido a que en su análisis se verá en base al porcentaje de rendimiento de la lactosa para la conversión al ácido láctico.
Propiedades del agente bacteriano	Esta variable es cuantificable ya que se hará un análisis previo de las características de las bacterias a utilizar.
Parámetros del suero de la leche y el ácido láctico	Esta variable es cuantitativa ya que las propiedades a analizar son medibles.

Fuente: Elaboración propia

4.2 Diseño de la investigación

El desarrollo de esta investigación a modo general consiste en encontrar los parámetros óptimos para la fermentación del suero de la leche con el *Lactobacillus Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y así poder obtener el mayor rendimiento de la lactosa al convertirse en ácido láctico. Los parámetros a evaluar son: Temperatura, Concentración del inóculo y el pH.

4.2.1 Diseño experimental

Se trabaja con el diseño de Box- Behnken de tres variables, tres niveles, un solo bloque y una réplica para contrastar la precisión del experimento, lo cual generó 30 corridas experimentales.

En la tabla 4.2 se presenta el plan experimental que generó el diseño de Box-Behnken con las combinaciones y repeticiones del proceso de fermentación, con estos datos se realizaron los experimentos y se registraron la cantidad de ácido láctico obtenida por experimentación.

TABLA N° 4.2
PLAN DE EXPERIMENTACIÓN DE LA FERMENTACIÓN

N°	PARAMETROS			LACTOSA
	T (°C)	C (g/ml)	pH	L (g/L)
1	40	0,15	6,0	*
2	40	0,15	6,0	*
3	40	0,15	5,0	*
4	40	0,15	5,0	*
5	40	0,20	5,5	*
6	40	0,20	5,5	*
7	40	0,10	5,5	*
8	40	0,10	5,5	*
9	41	0,20	5,0	*
10	41	0,20	6,0	*
11	41	0,15	5,5	*
12	41	0,10	5,0	*
13	41	0,20	5,0	*
14	41	0,15	5,5	*
15	41	0,15	5,5	*
16	41	0,15	5,5	*
17	41	0,10	6,0	*
18	41	0,10	5,0	*
19	41	0,10	6,0	*
20	41	0,15	5,5	*
21	41	0,15	5,5	*
22	41	0,20	6,0	*
23	42	0,10	5,5	*
24	42	0,20	5,5	*
25	42	0,10	5,5	*
26	42	0,15	6,0	*
27	42	0,15	6,0	*
28	42	0,20	5,5	*
29	42	0,15	5,0	*
30	42	0,15	5,0	*

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

T = Temperatura (°C)

C = Concentración de inóculo (g/L)

pH= Potencial de hidrógeno

L = Ácido láctico (g/L)

4.2.2 Etapas de investigación

Primera etapa de la investigación: Esta etapa consistió en el acondicionamiento del suero de la leche.

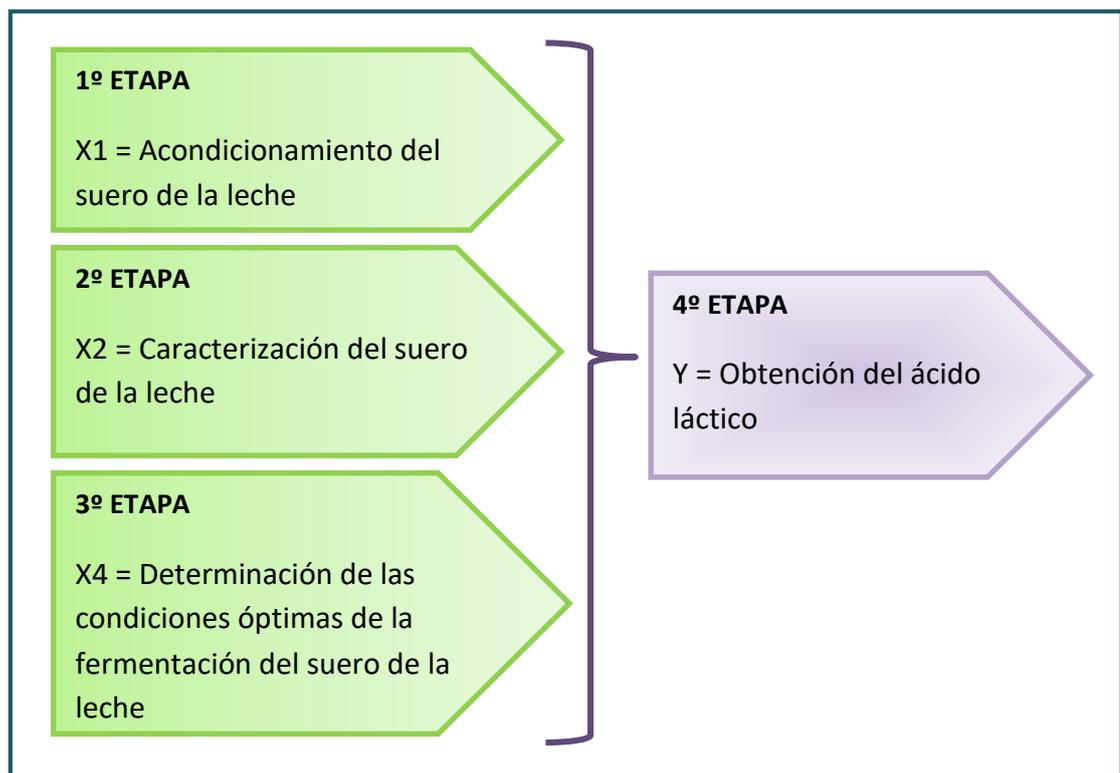
Segunda etapa de la investigación: Esta etapa consistió en la caracterización del suero de la leche identificando sus características físicas y químicas, como el pH, la concentración de lactosa y concentración de proteínas.

Tercera etapa de la investigación: Esta etapa consistió en determinar las condiciones óptimas del proceso de fermentación del suero de la leche para la obtención del ácido láctico, para lo cual se ha determinado la temperatura óptima, la concentración del inóculo óptimo y se registró los valores del pH a lo largo del proceso de fermentación.

Cuarta etapa de la investigación: Esta etapa consistió en la extracción del ácido láctico, su reconocimiento y la caracterización.

FIGURA Nº 4.1

ETAPAS DE LA INVESTIGACION



Fuente: *Elaboración propia*

4.3 Población y muestra

El universo son todas las lecherías artesanales que se encuentran en la provincia de Canta, las cuales son tres. En la tabla 4.3 se detalla las lecherías artesanales, y el suero que genera cada día estas.

TABLA N° 4.3
DATOS DE LOS RESIDUOS LACTICOS POR LECHERIA

	LECHERIA 1	LECHERIA 2	LECHERIA 3
Leche tratada diario (L)	400	200	60
Quesos producidos (Kg)	64	30	7
Suero obtenido (L)	360	120	40

Fuente: *Elaboración propia*

La población seleccionada será la lechería 1, ya que genera más residuos de suero de la leche lo cual es de 360 L de suero de la leche diaria.

Para determinar el tamaño de muestra, aplicaremos la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{(N - 1) * E^2 + Z^2 * p * q}$$

Donde:

$N = población$

$n = tamaño de la muestra$

$Z = factor de confiabilidad estadística$

$p = probabilidad a favor$

$q = probabilidad en contra$

$E = porcentaje de error$

Trabajaremos con un porcentaje de confianza de 95 % por lo cual el factor de confiabilidad será 1,96 y el porcentaje de error es igual a 5%, p toma el valor de 0,95 y q toman valores de 0,05.

$$n = \frac{1,96^2 * 0,95 * 0,05 * 360}{(360 - 1) * 0,05^2 + 1,96^2 * 0,95 * 0,05}$$

$$n = 46 L$$

Muestra: 46 L de suero de la leche.

4.4 Técnicas e instrumentación de recolección de datos.

A continuación, se menciona a las técnicas usadas por etapas del experimento.

a) Primera etapa de la investigación: acondicionamiento del suero de la leche.

- Desproteinización del suero de la leche.
- Filtración por gravedad
- Filtración al vacío
- Esterilización

b) Segunda etapa de la investigación: Caracterización del suero de la leche.

- Determinación de la lactosa: método NMX-219-1979
- Determinación de la proteínas: método NTP 202.119

c) Tercera etapa de investigación: Parámetros operacionales

- Método de análisis químico cuántico: Titulación

d) Cuarta etapa de la investigación

- Extracción química del ácido láctico

4.4.1 Equipos, Materiales y Reactivos

Equipos

- Autoclave de la marca ELECTRIC STERILIZER
- Balanza Analógica de la marca AND modelo GR-300.
- Bomba de vacío marca KNF NEUBERGER, modelo VDE 0530-MW63 / 4.
- Cocinilla de marca Surge.
- Contador de placa de marca KARL KOLB, modelo D-6072.
- Digestor de calefacción Kjeldahl marca VELP SCIENTIFICA modelo DK 6
- Destilador Kjeldahl de la marca VELP SCIENTIFICA modelo UDK 127
- Espectrómetro IR marca SHIMADZU modelo 8400S
- Espectrómetro UV marca VARIAN modelo CARY 50
- Incubadora marca MERMET.
- Potenciómetro de la marca HANNA INSTRUMENTS modelo HI 221.

Materiales

- Aro metálico

- Baguetas
- Bureta de 25 mL
- Embudos 100 mL
- Fiolas de 50 mL, 500 mL y 1L
- Lunas de reloj
- Matraces de 250 mL
- Papel filtro de 150 mm
- Papel filtro de 155 mm
- Piceta de 500 mL
- Pipetas de 5 mL y 10 mL
- Soporte
- Termómetro
- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Vasos precipitados de 150 mL, 250 mL, 500 mL y 600 mL.

Reactivos

- Ácido bórico al 5%
- Ácido clorhídrico 0,1 N y 12 M
- Ácido láctico al 99,8%
- Ácido nítrico concentrado.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Almidón al 98%

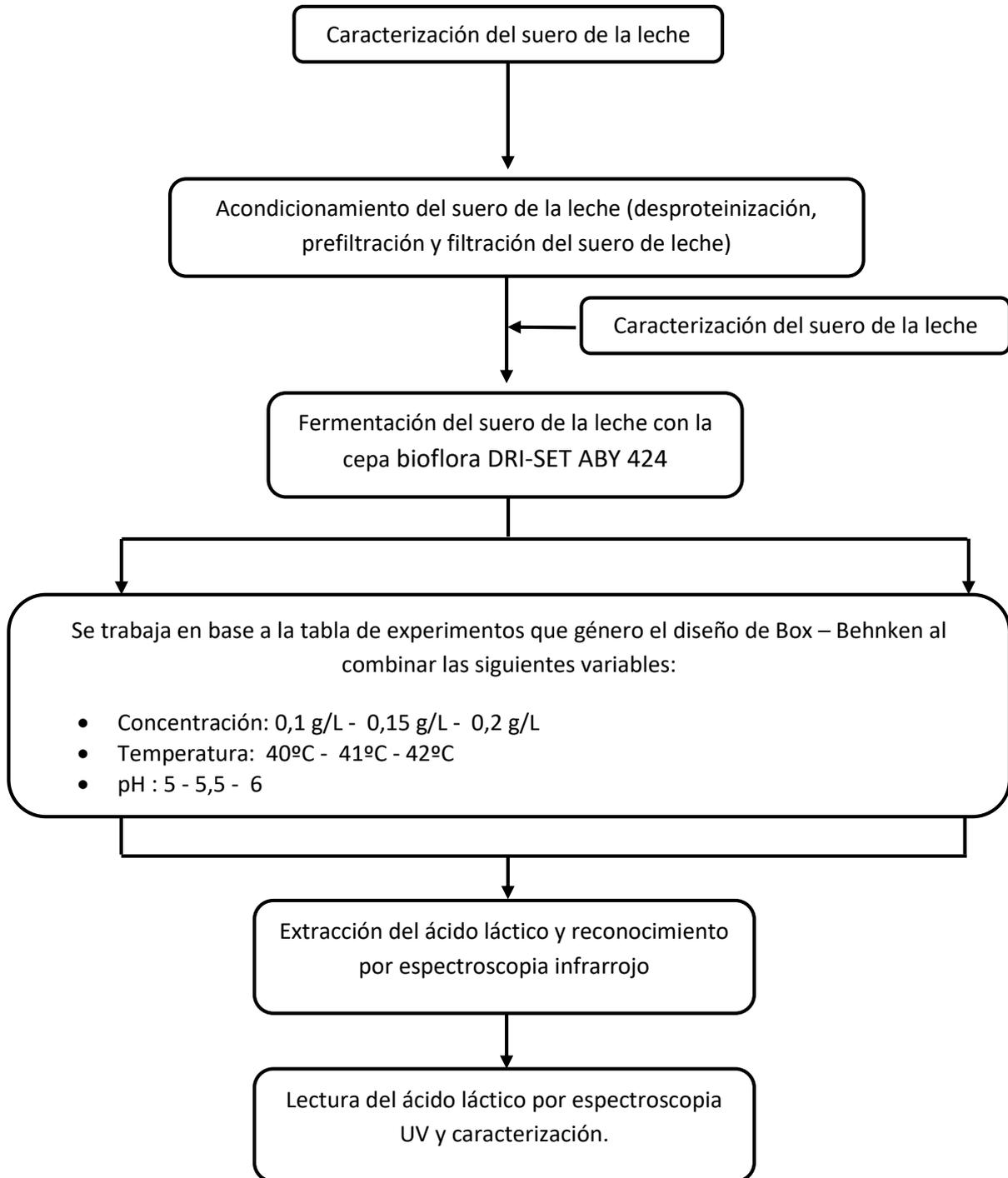
- Agua destilada
- Carbonato de calcio
- Cepa bioflora DRI-SET ABY 424
- Extracto de levadura
- Fosfato de amonio
- Hidróxido de sodio al 0,25 N y al 40%
- Indicador Tashiro (0,1% de azul de metileno y 0,1% de rojo de metileno)
- Sulfato de cobre al 99,7%
- Sulfato de potasio al 99,9%
- Sal de Seignette (Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado) al 98,5 %
- Tiosulfato de sodio 0,1 N
- Urea cristalizada al 99,5%
- Yoduro de potasio al 30%

4.5 Procedimientos de recolección de datos

Aquí se detalla los procedimientos que se realizaran por cada etapa de la investigación hasta la obtención del ácido láctico, a continuación, una representación del procedimiento experimental.

FIGURA Nº 4.2

REPRESENTACIÓN DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



Fuente: *Elaboración propia*

4.5.1 Primera etapa de investigación: Acondicionamiento del suero de la leche

Antes de iniciar con la etapa de acondicionamiento se separó 500 mL de suero de la leche para la posterior caracterización de este.

a) Desproteínización

Se realizó la desproteínización del suero de la leche restante, lo cual consistió en calentarlo hasta una temperatura 90 °C, una vez que se logró esta temperatura se dejó calentar por 20 minutos.

b) Pre – filtración

Posteriormente se dejó enfriar el suero de la leche y se empezó con la pre-filtración para eliminar los sólidos inertes. Esta pre-filtración lo llevamos a cabo con la filtración por gravedad para lo cual instalamos tres sistemas de filtración por gravedad (soporte, aro metálico, embudo, algodón, vaso precipitado de 500 mL y baguetes).

c) Filtración

Finalmente se realizó la filtración al vacío, para lo cual se realizó pruebas para escoger el medio filtrante adecuado, las pruebas fueron con dos tipos de papel filtro de la empresa Lab products et services:

- Papel filtro N° 389 con numero de micra igual a 150 mm
- Papel filtro N° 393 con numero de micra igual a 155 mm

d) Esterilización

Terminado con el acondicionamiento del suero de la leche separamos 500 mL y lo guardamos para la posterior caracterización y el suero de la leche restante se colocó en botellas de vidrio de un litro, y estos se esterilizaron en el autoclave de la marca ELECTRIC STERILIZER una presión de 10 Psi, temperatura de 120 °C y un tiempo de 15 min.

4.5.2 Segunda etapa de investigación: caracterización del suero de la leche

a) Cantidad de lactosa: método NMX-219-1979

Se determinó la lactosa antes y después del acondicionamiento del suero de la leche siguiendo los siguientes pasos:

Se pesó 12,5 g aproximadamente de suero de la leche en un matraz aforado de 500 mL; se añadió cerca de 200 mL de agua y se agito; se añadió 15 mL de solución de Fehling I y se agito; después 10 mL de hidróxido de sodio 0,25 N y se agito. Y se afora con agua. Se mezcló y se filtró.

En el vaso precipitado de 600 mL se colocó 25 mL de Fehling I, 25 mL de Fehling II y 50 mL de agua , Dejandolo hervir por 5 minutos cubriendose con una luna de reloj.

Se tomó 50 mL de la solución filtrada con una pipeta de dicha capacidad y se añadió en la mezcla Fehling hirviente, continuando la ebullición durante 6 minutos exactos, sin quitar la luna de reloj.

Esta solución se filtró por el embudo de Allihn conectado al sistema de vacío.

Se colocó el embudo de Allihn en el matraz Erlenmeyer de 300 mL; se agregó 5 mL de ácido nítrico 1:1 a un matraz Erlenmeyer de 100 mL, y se calentó. La mitad del ácido se vierte con precaución en el embudo de Allihn, y el resto en el vaso para disolver las trazas de óxido de cobre (I); después de la disolución completa se filtró al vacío.

Se calentó la solución de nitrato de cobre (volumen total 50 - 70 mL) hasta ebullición después se añadió con cuidado cerca de 1,5 g de urea y se continuo la ebullición durante un minuto. Se dejó enfriar y después se adiciono 10 mL de yoduro de potasio al 30 % y se tituló inmediatamente el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N, añadiendo al final de la titulación 10 mL de la solución de almidón como indicador. Para calcular el porcentaje de lactosa se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lactosa} = \frac{M * 10 * 100}{P}$$

Donde:

M = Peso en gramos de lactosa

P = Peso en gramos de la muestra

10 = Dilución de alicuota

b) Cantidad de proteínas: método NTP 202.119

Se determinó la cantidad de proteínas antes y después de la desproteinización

Se añadió 12 g de K_2SO_4 , 1g de $CuSO_4$ en un tubo de kendorjal , luego se añadió 5 mL aproximadamente de muestra con 20 mL de H_2SO_4 .

Luego se llevó a digerir a una baja temperatura inicial para controlar la espuma (aproximadamente $180^{\circ}C$ a $230^{\circ}C$), esto por un tiempo de 30 minutos, después se aumentó la temperatura a $410^{\circ}C$ a $430^{\circ}C$ y se digirió hasta aclarar (de un color azul-verde claro) y a partir de ese viraje se dejó una hora digiriendo.

Se añadió 55 mL de NaOH al tubo de kendorjal en frío y se llevó al equipo de destilación, la recepción se realizó en 50 mL de H_3BO_3 con tres gotas de indicador tashiro. Se dejó destilar hasta que en el receptor tenga 200mL. Se tituló lo recibido con HCL 0,1 N con viraje de verde a rojo. La siguiente ecuación determina la cantidad:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{1,4007 * (vg - vb) * N}{w}$$

Donde:

Vg= volumen gastado

Vb= volumen del blanco

N= Normalidad del acido

W= peso de muestra

c) pH

La determinación del pH se realizó antes del acondicionamiento y después del mismo.

Se determinó el pH del suero de la leche mediante un potenciómetro de la marca HANNA INSTRUMENTS, se realizó tres mediciones en distintos puntos del cual se obtuvo tres valores de pH y se sacó un promedio, la medición del pH se realizó a temperatura ambiente.

4.5.3 Tercera etapa de investigación: Parámetros operacionales

a) Crecimiento microbiano

En esta etapa se determinará el tiempo de fermentación y el rango óptimo para las concentraciones del inóculo, es decir el rango donde tendrán mayor crecimiento. Con esta finalidad se realizó el crecimiento microbiano al pH óptimo de 5.5 (Rojas,2015).

➤ Preparación del inóculo

Las bacterias de la cepa DRI-SET ABY 424 se activaron en una solución de agua peptonada al 1,0%, con adición de suero de la leche y glucosa en porcentajes de 2,5 y 1,0 % respectivamente, por 12h a 40°C. Este cultivo fue usado como inóculo para las pruebas de crecimiento microbiano. Los pesos de la cepa para las pruebas fueron de 0,1 g, 0,2 g y 0,3 g. Todo esto se realizó en volumen de 20 mL. (Rojas, 2015)

➤ **Fermentación**

Para la fermentación se trabajó con las botellas de leche esterilizadas en la última etapa de acondicionamiento del suero de la leche. A estas botellas se añadieron los inóculos preparados y 10 g de carbonato de calcio (CaCO_3) y se trabajó con las temperaturas límites del rango óptimo las cuales fueron de 40 °C y 42°C.

➤ **Sembrado**

El sembrado se realizó con el Agar Plate Count ya que tiene el medio necesario para el crecimiento tanto del Streptococcus Termophilus y Lactobacillus Bulgaricus. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

Primero se preparó 0,2 % de solución peptonada para realizar las diluciones y poder realizar el recuento de manera más precisa, de esta solución se añadió 10 mL a tubos de ensayo con tapa rosca y estos se autoclavaron a 120 °C a una presión de 10 psi por un tiempo de 15 minutos.

Se extrajeron muestras aproximadamente cada 4 horas y se realizó de la siguiente manera: primero se extrajo 1 mL de la solución fermentada, lo cual lo añadimos a un tubo de ensayo (A) que ya contenía 10 mL de solución peptonada, seguidamente se sacó 1 mL de solución diluida del tubo de ensayo A y se coloca en otro tubo de ensayo (B) que también ya contenía 10 mL de solución peptonada, esto lo realizamos hasta una dilución de 10^{-3} en algunos casos se realizó hasta 10^{-6} por motivos del crecimiento celular a ciertos tiempos.

Se sacó 1mL de cada dilución final y se colocó en una placa Petri, se realizó la siembra en un lugar estéril y cerca al calor, para lo cual nos ayudamos con un mechero y para la esterilización de los materiales a usar utilizamos alcohol a 96° , después colocamos el Agar en la placa y realizamos movimientos circulares para distribuir el Agar en la placa. Esperamos que el Agar se solidifique y lo llevamos a incubadoras de la marca MERMET a 40°C y 42°C . y finalmente se realizó el conteo de placas en un contador de la marca KARL KOLB.

b) Fermentación

Para la fermentación se utilizó los rangos establecidos de acuerdo a las pruebas del crecimiento microbiano, este rango fue de 0,1 – 0,2 g/L de la cepa. La preparación del inóculo fue de la misma forma en la que se realizó para el crecimiento microbiano.

La fermentación se realizó en batch de 1 L, donde el suero de la leche fue previamente suplementado con el objetivo de aumentar el rendimiento de producción de ácido láctico, los suplementos usados fueron el extracto de levadura y el fosfato de amonio y se añadió también el carbonato de calcio como neutralizante. La cantidad que se añadió por batch son las siguientes: (Rojas, 2015)

- 10% de carbonato de calcio
- 0,9% fosfato de amonio
- 0,5 % extracto de levadura

Teniendo en claro las condiciones de la fermentación se trabajó con las botellas de suero de la leche esterilizadas a lo cual se añadió los suplementos en las proporciones ya mencionadas.

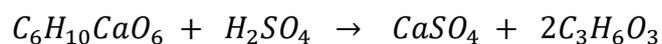
El tiempo óptimo de fermentación fue de 72 h. esto quedo establecido con el análisis del crecimiento microbiano que se realizó.

Para controlar la acidez de la fermentación se optó por sacar muestras de 5 mL y titularlas con NaOH a 0,1 M para ver la formación de ácido.

4.5.4 Cuarta etapa de investigación

a) Extracción de ácido láctico

Del suero fermentado se extrajo 100 mL, se calentó por 5 minutos para solubilizar el lactato de calcio formado en la fermentación y coagular las proteínas presentes posteriormente se filtró para eliminar los sólidos luego se dejó enfriar y se añadió ácido sulfúrico concentrado 1 mL para obtener ácido láctico libre este se calculó mediante la siguiente ecuación:



Después se filtró para eliminar el sulfato de calcio formado, Es así como extrajimos el ácido láctico el cual finalmente fue concentrado por evaporación.

b) Caracterización del ácido láctico

➤ Reconocimiento del ácido láctico

Se identificó la formación de ácido láctico mediante la espectrofotometría infrarrojo comparándolo con un patrón de ácido láctico donde los espectrogramas tendrán que tener los picos característicos de la molécula por lo cual reconocimos el ácido láctico, esto se llevó a cabo en el equipo infrarrojo FTIR (infrarrojo con transformadas de Fourier) de la marca SHIMADZU modelo 8400S.

➤ Concentración del ácido láctico

Para determinar la concentración realizamos primero la curva de calibración en el espectrofotómetro de la marca varian CARY 50 y después se realizó la lectura de las muestras.

Preparación de la curva de calibración.

Para la realización de la curva de calibración, se preparó muestras patrón con ácido láctico al 99,8%.

Primero se preparó una solución de ácido láctico para ello se colocó en una fiola de 500 mL; 16,6 mL de ácido láctico y se enrasó en 500 mL de agua destilada para obtener una solución de concentración 39,96 g/L. Luego de esa concentración se extrajo 12,5 mL en una fiola de 50 mL para obtener una solución de concentración de 9,99 g/L.

Se extrajo 25 mL de una concentración de 39,96 g/L y se enrasó en una fiola de 50 mL para obtener una solución de concentración 19,98 g/L y finalmente se colocó en una fiola de 500 mL; 12,5 mL de ácido láctico y se enrasó con agua destilada para obtener una solución de concentración de 29,94 g/L.

Lectura de las muestras

Se realizó las lecturas de las muestras en un espectrofotómetro de la marca Varian CARY 50, donde mediante la curva de calibración nos ayudamos a tener las concentraciones de ácido láctico presente en la fermentación.

4.6 Procesamiento estadístico y análisis de datos

El procesamiento estadístico se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta en el software MINITAB.17 donde se trabajó con el diseño Box-Behnken.

4.6.1 Tratamiento estadístico

La experimentación realizada fue mediante el diseño de Box Behnken con tres niveles, lo cual permitió evaluar simultáneamente las variables y la interacción de estas, en total se realizó 30 experimentos, que es equivalente a un bloque con una réplica.

4.6.2 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por la metodología de superficies de respuestas que consiste en: una estrategia de experimentación secuencial y modelación que permite estimar las condiciones óptimas de operación de un proceso y mejorar significativamente su resultado en cuanto a costos, tiempos, eficiencia, productividad, cumplimiento de especificaciones y en fin, mejorar su calidad. La estrategia de análisis supone que el

promedio (media) de la variable de respuesta está en función de los niveles cuantitativos representados por los factores x_1 , x_2 , ..., x_k . Los modelos polinomiales son los utilizados para efectuar una aproximación práctica a la función de respuesta verdadera o real. Los desarrollos incorporados hasta ahora en programas computacionales permiten analizar fácilmente y en forma gráfica modelos polinomiales de primer (efectos lineales y de interacción) y segundo orden (efectos lineales, cuadráticos y de interacción).

Para este análisis se utilizó como software el MINITAB.17 y el Excel 2013. En el software se introdujo los tres niveles de las variables ya establecidas y con ello se obtuvo el diseño experimental, una vez obtenido los resultados de cada experimento estos son introducidos en la columna de respuestas del software y con ello el software se encarga de modelar un ecuación y finalmente encontrar las variables optimas del proceso.

V. RESULTADOS

5.1 Acondicionamiento de la materia prima y del medio.

En la etapa de filtración, la malla óptima para la retención de sólidos fue la de **155 mm**.

El acondicionamiento de la materia prima ayudó para obtener un medio óptimo de crecimiento microbiano y por ende al rendimiento de la lactosa en la obtención del ácido láctico, en la tabla 5.1 se muestra la comparación de las **propiedades antes y después del acondicionamiento del suero de la leche**.

TABLA 5.1
CARACTERÍSTICAS DEL SUERO DE LA LECHE

Propiedades	Suero de la leche antes del acondicionamiento	Suero de la leche después del acondicionamiento
Cantidad de lactosa (%)	4,7	4,8
Proteínas (%)	0,72	0,5
pH	5.5	6.0

Fuente: *Elaboración Propia*

5.2 Crecimiento microbiano

Para analizar el crecimiento microbiano se realizó el conteo de las colonias en las placas sembradas, esto se realizó con el contador de la marca Karl Kolb, los resultados se registraron en las tablas 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4 y las curvas de crecimiento de cada experimento se aprecian en las gráficas 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4 respectivamente. Se determinó que el rango óptimo de la concentración del con el cual trabajamos fue de 0,1 – 0,2 g. y el tiempo de fermentación es de 76h.

TABLA N° 5.2

TABLA DE CRECIMIENTO CELULAR A

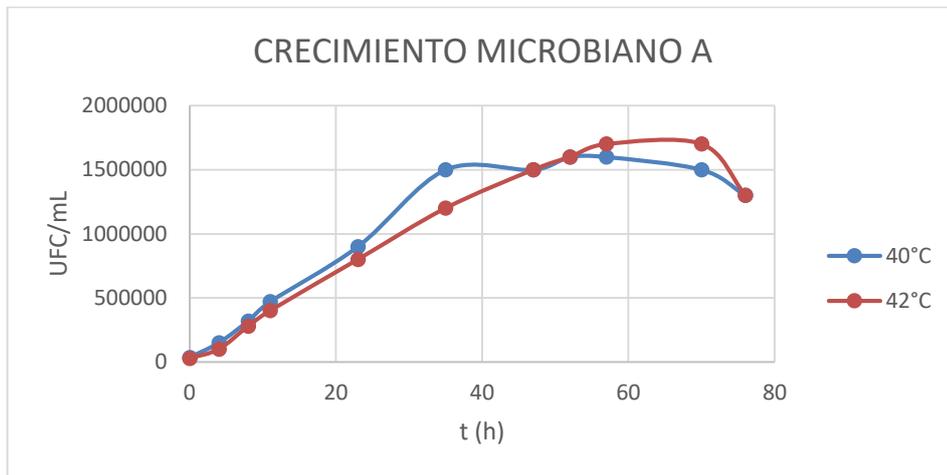
	T = 40 °C C = 0,1 g/L	T = 42 °C C = 0,1 g/L
t(h)	UFC/mL	UFC/mL
0	36000	28000
4	150000	100000
8	320000	280000
11	470000	400000
23	900000	800000
35	1500000	1200000
47	1500000	1500000
52	1600000	1600000
57	1600000	1700000
70	1500000	1700000
76	1300000	1300000

Fuente: *Elaboración Propia*

GRAFICO N° 5.1

CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR A

T=40°C Y T=42°C A 0.1 g/L.



Fuente: *Elaboración Propia*

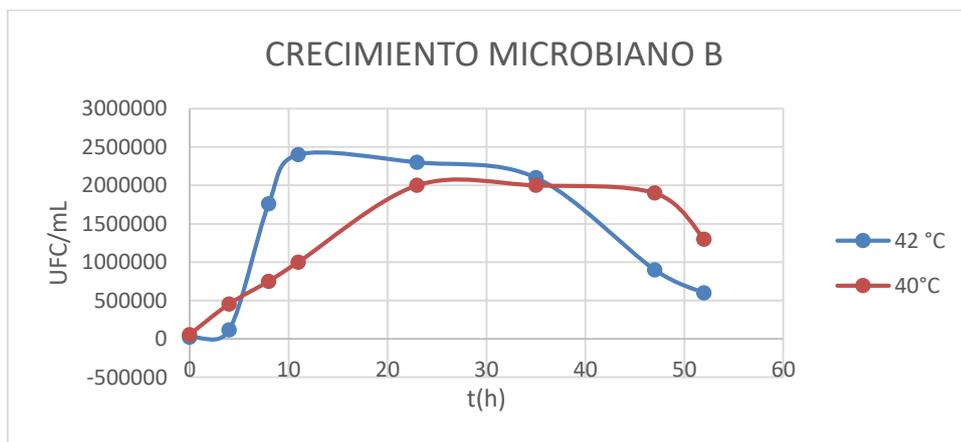
TABLA N° 5.3

TABLA DE CRECIMIENTO CELULAR B

	T = 40 °C C = 0,2 g/L	T = 42 °C C = 0,2 g/L
t(h)	UFC/mL	UFC/mL
0	23000	55000
4	115000	453000
8	1760000	750000
11	2400000	1000000
23	2300000	2000000
35	2100000	2000000
47	900000	1900000
52	600000	1300000

Fuente: *Elaboración Propia*

GRAFICO N° 5.2
CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR B
T=40°C Y T=42°C A 0.2 g/L.



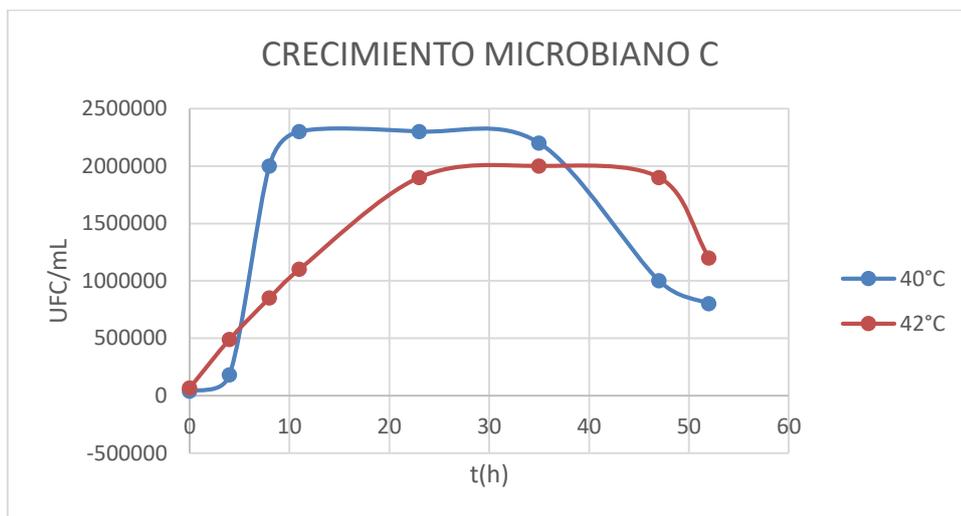
Fuente: *Elaboración Propia*

TABLA N° 5.4
TABLA DE CRECIMIENTO CELULAR C

	T = 40 °C C = 0,3 g/L	T = 42 °C C = 0,3 g/L
t(h)	Ufc/mL	Ufc/mL
0	38000	66000
4	180000	490000
8	2000000	850000
11	2300000	1100000
23	2300000	1900000
35	2200000	2000000
47	1000000	1900000
52	800000	1200000

Fuente: *Elaboración Propia*

GRAFICO N° 5.3
CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR C
T=40°C Y T=42°C A 0.3 g/L.



Fuente: *Elaboración Propia*

5.3 Fermentación

En el proceso de fermentación se extrajo 5 ml de muestra aproximadamente cada 3 h y estas fueron tituladas con NaOH (0.1 M), esto con la finalidad de controlar la acidez de la fermentación. Así se obtuvo los siguientes gastos de NaOH (0.1 M) en la titulación

TABLA 5.5
CONTROL DE LA FERMENTACION

Nº exp.	Parámetros			Vol. Gastado de NaOH 0.1M (mL)											
	T (°C)	C (g)	pH	Día 1				Día 2				Día 3			
				9 am	12 am	3pm	6 pm	9 am	12 am	3pm	6 pm	9 am	12 am	3pm	6 pm
1	40	0.15	6	3,6	4,8	6,3	8,1	8,9	9,5	10,1	10,4	10,7	11,2	11,9	12
2	40	0.15	6	3,5	4,6	6,5	8,2	8,8	9,4	10,1	10,4	10,8	11,5	12	12,1
3	40	0.1	5.5	3,9	4,6	5,6	8,7	9,8	11,0	11,5	11,7	12,4	13,8	13,9	13,8
4	40	0.1	5.5	3,9	4,6	5,6	8,7	9,8	11,0	11,5	11,7	12,4	13,8	13,9	13,8
5	40	0.15	5	3,8	4,1	5,9	7,7	8,5	9,0	10,4	11,4	12,6	12,8	12,7	12,7
6	40	0.15	5	3,8	4,1	5,9	7,7	8,5	9,0	10,4	11,4	12,6	12,8	12,7	12,8
7	40	0.15	5	3,8	4,1	5,9	7,7	8,5	9,0	10,4	11,4	12,6	12,8	12,7	12,8
8	40	0.1	5.5	3,9	4,8	5,7	8,7	9,9	11,1	11,5	11,6	12,5	13,8	13,9	13,8
9	40	0.2	5.5	3,3	4,8	6,1	7,3	8,6	9,2	9,9	10,5	11,0	11,8	12,4	12,5
10	41	0.15	5.5	4,3	5,2	6,9	8,9	10,0	10,6	11,2	11,8	13,7	13,8	13,7	13,7
11	41	0.15	5.5	3,5	4,0	5,6	6,2	8,3	9,3	10,0	10,7	11,3	12,0	12,3	12,3
12	41	0.15	5.5	3,5	4,0	5,6	6,2	8,3	9,3	10,0	10,7	11,3	12,0	12,3	12,3
13	41	0.1	6	4,2	4,8	5,9	8,6	9,7	10,8	11,4	11,8	12,5	13,9	13,9	14
14	41	0.15	5.5	3,3	4,7	6,0	7,4	8,7	9,2	9,8	10,5	11,1	11,7	12,4	12,5
15	41	0.2	6	4,0	4,8	5,7	8,5	8,9	9,3	9,5	10,7	12	12,2	13,1	13,1
16	41	0.2	6	3,9	4,7	5,8	8,6	9,0	9,4	9,8	10,6	11,8	12,0	12,9	13
17	41	0.15	5.5	4,1	5,2	6,9	8,9	10,3	10,8	11,3	11,9	13,6	13,8	13,9	13,8
18	41	0.15	5.5	4,3	5,2	6,9	8,9	10,0	10,6	11,2	11,8	13,7	13,8	13,7	13,7
19	41	0.2	5	3,7	4,5	6,0	7,1	8,1	9,5	10,1	11,8	12,8	13,5	13,4	13,5
20	41	0.1	5	4,2	4,9	5,7	9,5	11,4	11,9	11,6	12,5	13,1	14,0	14,1	14
21	41	0.2	5	3,6	4,4	6,0	7,2	8,1	9,6	10,1	11,7	12,7	13,5	13,4	13,4
22	42	0.1	5.5	4,3	5,3	7,9	9,2	10,8	11,8	12,5	13,5	14,7	14,7	14,8	14,7
23	42	0.2	5.5	3,4	4,2	5,8	6,7	8,9	9,5	10,8	11,2	11,7	12,2	12,8	12,8
24	42	0.1	5.5	4,3	5,4	7,7	9,3	10,6	11,9	12,6	13,4	14,7	14,6	14,6	14,6
25	42	0.15	6	4,6	6,8	7,1	8,9	10,1	10,9	11,8	12,1	14,2	14,3	14,3	14,3
26	42	0.15	6	4,6	6,7	7,1	8,9	10,0	10,8	11,6	12,3	14,2	14,2	14,3	14,4
27	42	0.15	6	4,6	6,7	7,1	8,9	10,0	10,8	11,6	12,3	14,2	14,2	14,3	14,4
28	42	0.15	6	4,6	6,8	7,1	8,9	10,1	10,9	11,8	12,1	14,2	14,3	14,3	14,3
29	42	0.2	5.5	3,3	4,2	5,8	6,6	8,7	9,5	10,6	11,0	11,5	12,0	12,7	12,8
30	42	0.15	5	4,6	6,8	7,2	9,7	10,5	11,2	11,8	12,9	14,3	14,4	14,4	14,5

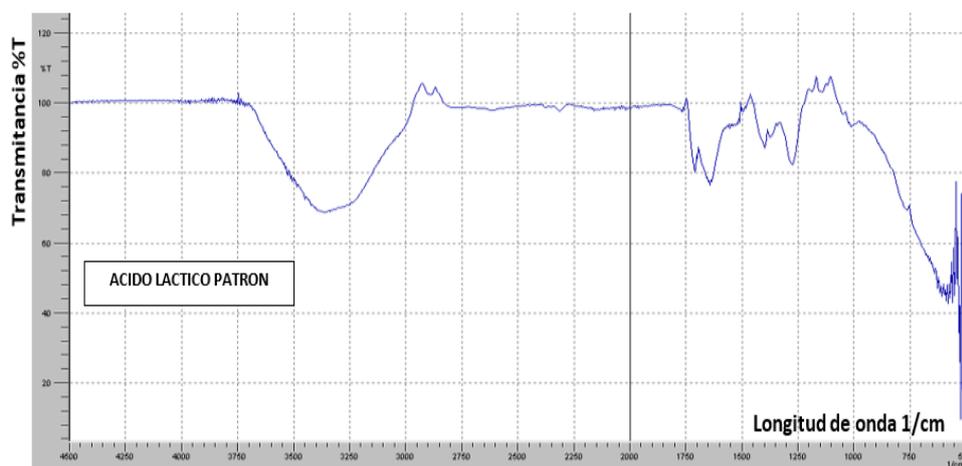
Fuente: *Elaboración Propia*

5.4 Caracterización del ácido láctico

5.4.1 Reconocimiento del ácido láctico

Esto se realizó mediante el infrarrojo FTIR, donde se comparó las muestras con un patrón de ácido láctico al 99,8%. Con la finalidad validar la formación del ácido láctico. La figura 5.1 representa el espectro del ácido láctico patrón y las figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 son representaciones de los espectros de las muestras de forma se realizó las comparaciones para el reconocimiento del ácido láctico.

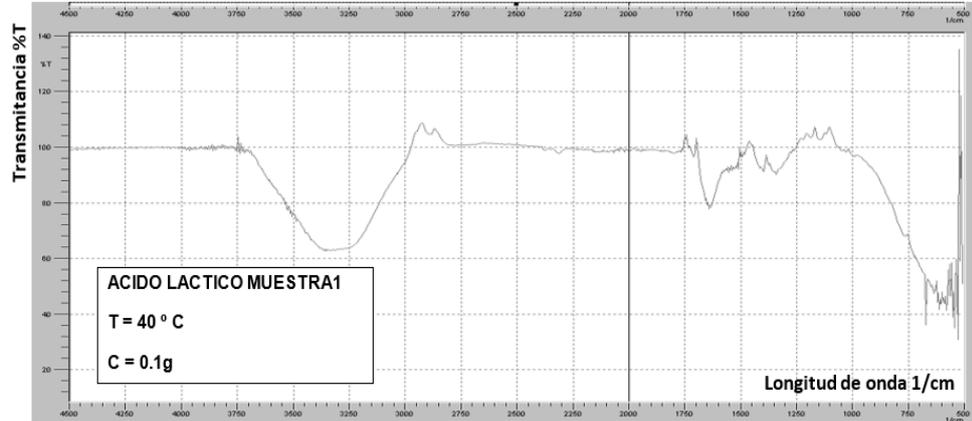
FIGURA Nº 5.1
ESPECTRO DEL ÁCIDO LÁCTICO PATRÓN



Fuente: *Elaboración propia*

FIGURA Nº 5.2

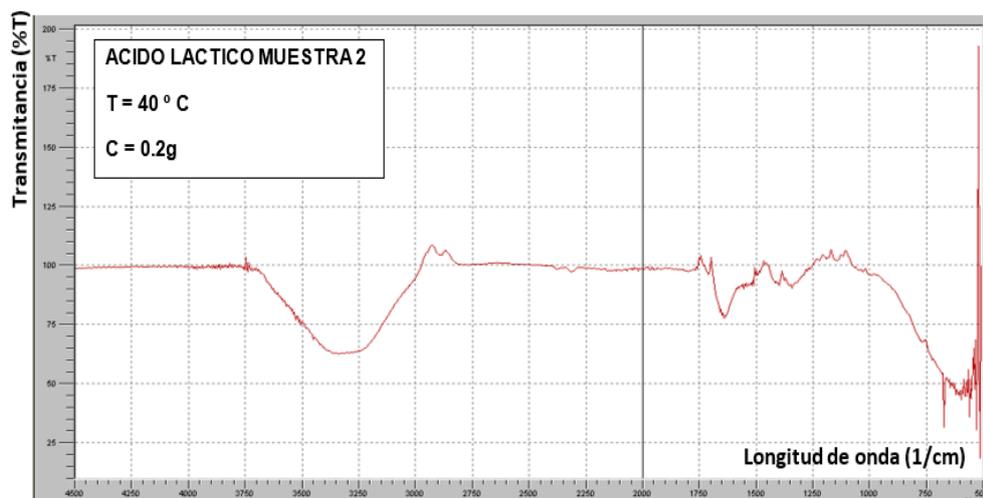
MUESTRA 1 LEIDO EN EL ESPECTROMETRO INFRARROJO FTIR



Fuente: *Elaboración propia*

FIGURA Nº 5.3

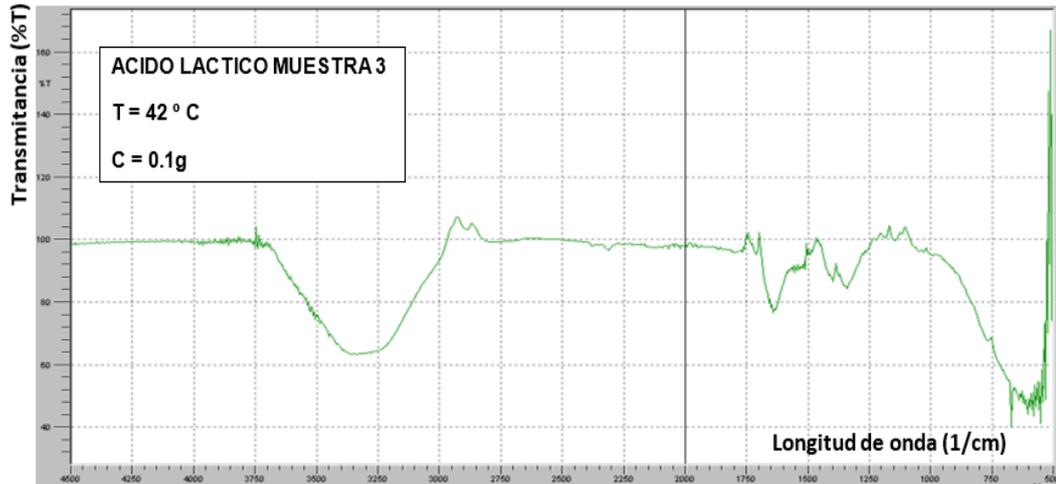
MUESTRA 2 LEIDO EN EL ESPECTROMETRO INFRARROJO FTIR



Fuente: *Elaboración propia*

FIGURA Nº 5.4

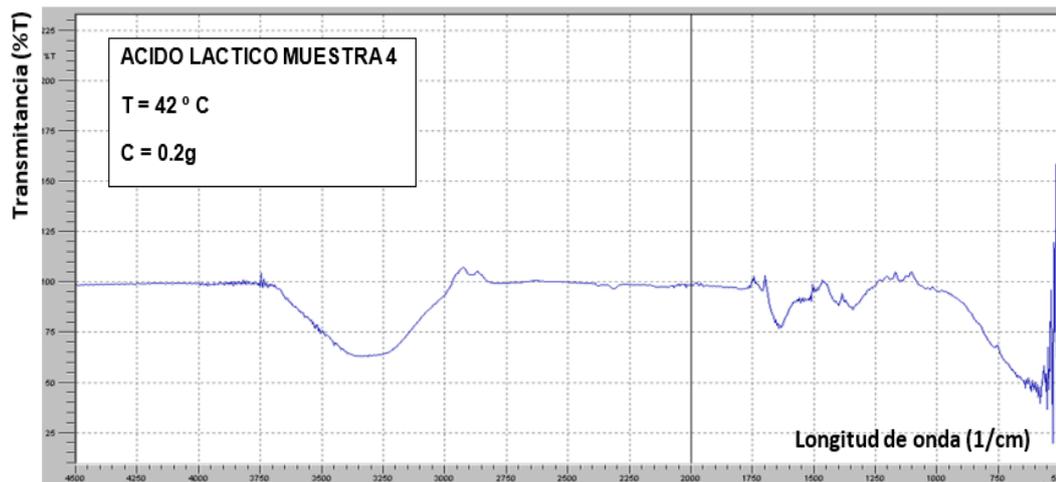
MUESTRA 3 LEIDO EN EL ESPECTROMETRO INFRARROJO FTIR



Fuente: *Elaboración propia*

FIGURA Nº 5.5

MUESTRA 4 LEIDO EN EL ESPECTROMETRO INFRARROJO FTIR

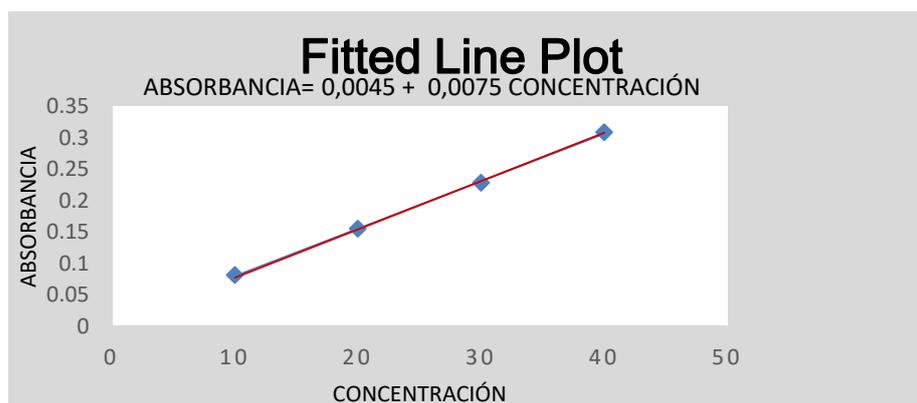


Fuente: *Elaboración propia*

5.4.2 Concentración del ácido láctico.

Para hallar las concentraciones de ácido láctico de las muestras realizamos un curva de calibración con un patrón de ácido láctico (ver grafica 5.4). Se determinó las absorbancias de cada patrón reemplazando las concentraciones, esto se presenta en la tabla 5.6.

GRAFICA Nº 5.4
CURVA PATRÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO



Fuente: *Elaboración Propia*

TABLA Nº 5.6
DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

CONCENTRACIÓN (g/L)	ABSORBANCIA
9,99	0,081
19,98	0,155
29,94	0,228
39,96	0,308

Fuente: *Elaboración Propia*

5.4.3 Lecturas de las Muestras

Se realizó las lecturas de las muestras para hallar la Absorbancia, después se reemplaza el valor obtenido en la ecuación de la curva de calibración para hallar la concentración del ácido láctico, los resultados se presentan en la tabla 5.7.

TABLA Nº 5.7

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DEL ÁCIDO LÁCTICO

Experimento	Absorbancia	Concentración (g/L)
1	0,228	29,8
2	0,226	29,5
3	0,252	33
4	0,272	35,6
5	0,296	38,9
6	0,245	32,1
7	0,272	35,6
8	0,292	38,3
9	0,233	30,5
10	0,261	34,2
11	0,279	36,6
12	0,266	34,8
13	0,242	31,6
14	0,288	37,8
15	0,270	35,4
16	0,286	37,5
17	0,274	35,9
18	0,243	31,8
19	0,248	32,5
20	0,231	30,2
21	0,234	30,6
22	0,281	36,8
23	0,278	36,5
24	0,235	30,7
25	0,291	38,2
26	0,278	36,5
27	0,233	30,5
28	0,231	30,2
29	0,254	33,2
30	0,243	31,8

Fuente: *Elaboración Propia*

5.5 Optimización del proceso

Se registraron los resultados de ácido láctico obtenido en cada experimento en la tabla 5.8, estos datos serán introducidos al diseño de Box- Benhken para la optimización del proceso obteniendo así los parámetros óptimos.

TABLA N° 5.8

VARIABLES OPERACIONALES Y RESPUESTA

N°	PARAMETROS			ÁCIDO LÁCTICO
	T (°C)	C (g/ml)	pH	L (g/L)
1	40	0,15	6,0	29,8
2	40	0,15	6,0	29,5
3	40	0,15	5,0	31,8
4	40	0,15	5,0	31,6
5	40	0,20	5,5	30,5
6	40	0,20	5,5	30,7
7	40	0,10	5,5	35,6
8	40	0,10	5,5	35,9
9	41	0,20	5,0	34,2
10	41	0,20	6,0	33,0
11	41	0,15	5,5	32,2
12	41	0,10	5,0	36,6
13	41	0,20	5,0	34,8
14	41	0,15	5,5	32,1
15	41	0,15	5,5	30,2
16	41	0,15	5,5	30,6
17	41	0,10	6,0	36,8
18	41	0,10	5,0	36,6
19	41	0,10	6,0	36,8
20	41	0,15	5,5	30,5
21	41	0,15	5,5	30,2
22	41	0,20	6,0	33,2
23	42	0,10	5,5	38,3
24	42	0,20	5,5	32,5
25	42	0,10	5,5	38,3
26	42	0,15	6,0	37,8
27	42	0,15	6,0	37,5
28	42	0,20	5,5	32,5
29	42	0,15	5,0	38,2
30	42	0,15	5,0	38,0

Fuente: *Elaboración Propia*

5.5.1 Análisis del diseño de superficie de respuestas

En la figura 5.6 se observa que los valores de P para la temperatura y la concentración con menores a 0,05 lo cual nos indica que son variables influenciables en el proceso, sin embargo el valor alto de P para el pH nos indica que esta variable es poco influenciable en el proceso.

FIGURA Nº 5.6
ANALISIS DE VARIANZA

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	232.173	25.7970	12.80	0.000
Lineal	3	166.061	55.3537	27.46	0.000
temperatura	1	89.776	89.7756	44.54	0.000
concentracion	1	72.676	72.6756	36.05	0.000
pH	1	3.610	3.6100	1.79	0.196
Cuadrado	3	63.046	21.0153	10.43	0.000
temperatura*temperatura	1	9.660	9.6603	4.79	0.041
concentracion*concentracion	1	31.604	31.6041	15.68	0.001
pH*pH	1	30.469	30.4688	15.11	0.001
Interacción de 2 factores	3	3.066	1.0221	0.51	0.682
temperatura*concentracion	1	0.661	0.6612	0.33	0.573
temperatura*pH	1	1.280	1.2800	0.63	0.435
concentracion*pH	1	1.125	1.1250	0.56	0.464
Error	20	40.316	2.0158		
Falta de ajuste	3	33.171	11.0571	26.31	0.000
Error puro	17	7.145	0.4203		
Total	29	272.490			

Fuente: MINITAB.17

En la figura 5.7 se observa que el R² es mayor al 70% lo cual indica que el modelo se ajusta al diseño experimental.

FIGURA Nº 5.7

RESUMEN DEL MODELO

Resumen del modelo		
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)
1.41979	85.20%	78.55%

Fuente: *MINITAB.17*

La Ecuación de regresión en unidades no codificadas es:

$$\begin{aligned} \text{Ácido láctico (g/L)} = & 2265 - 95,0 \cdot T + 27 \cdot C - 120,9 \cdot \text{pH} + \\ & 1,144 \cdot T^2 + 828 \cdot C^2 + 8,12 \cdot \text{pH}^2 - 5,8 \cdot T \cdot C + 0,80 \cdot T \cdot \text{pH} - \\ & 15,0 \cdot C \cdot \text{pH} \end{aligned}$$

Donde:

T = Temperatura (°C)

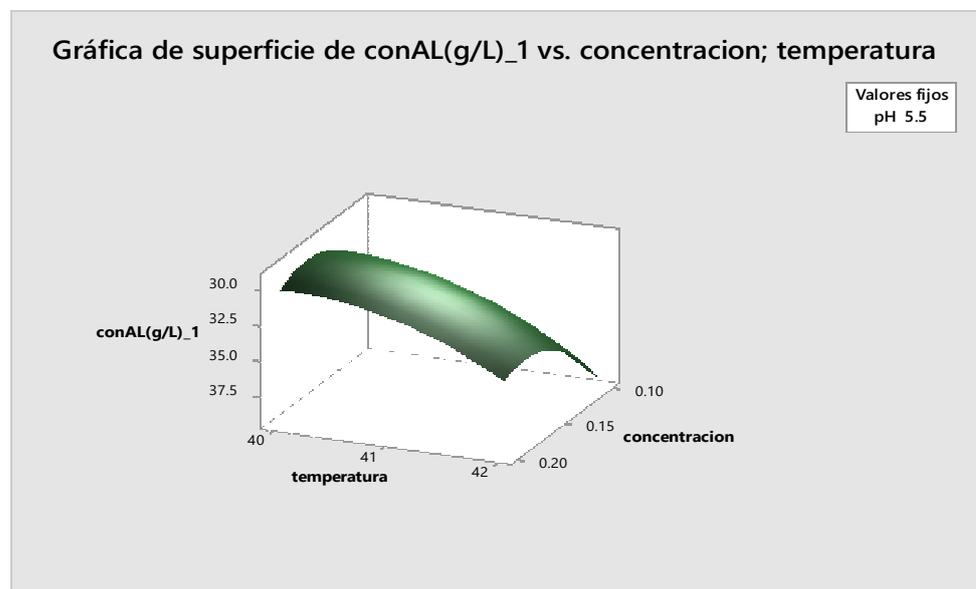
C = Concentración de inóculo (g/L)

pH= Potencial de Hidrogeno

La gráfica 5.5 muestra la gráfica de optimización de los parámetros óptimos del proceso de fermentación, dicha grafica es generada por el diseño Box-Benhken.

GRAFICA Nº 5.5

GRAFICA DE SUPERFICIE



Fuente: MINITAB.17

5.5.2 Resultado de la optimización

En la figura 5.8 y en la gráfica 5.6 se da a conocer los valores óptimos de los parámetros para la fermentación estos fueron determinadas usando la metodología de superficie de respuestas y el diseño Box-Behnken determino.

FIGURA Nº 5.8

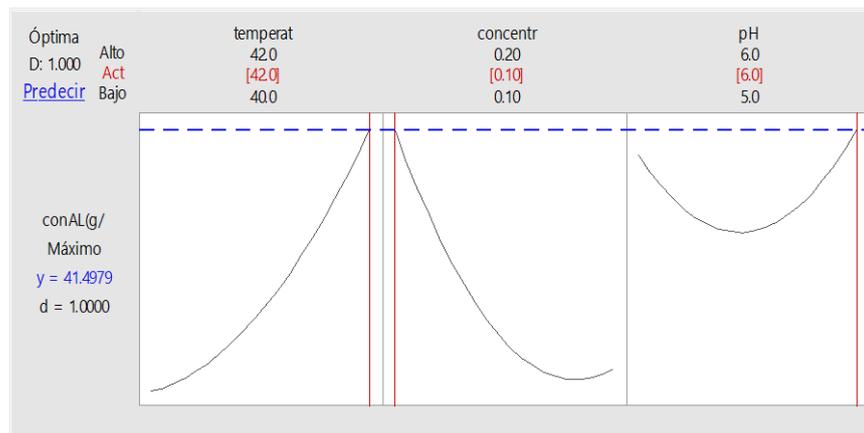
ANALISIS DE LA OPTIMIZACION DE LA RESPUESTA

Solución						
Solución	temperatura	concentracion	pH	conAL(g/L)_1 Ajuste	Deseabilidad compuesta	
1	42	0.1	6	41.4979	1	

Fuente: MINITAB.17

GRAFICA Nº 5.6

GRAFICA DE OPTIMIZACION



Fuente: MINITAB.17

5.6 Validación del modelo

Se comprobó el modelo utilizando las variables optimas de temperatura, concentración de inculo y pH (42 °C, 0,1 g/L y 6,0). Obteniéndose como concentración de ácido láctico 40,51 g/L teniendo una variación de 2,44 % del valor del modelo siendo una variación poco significativa, debido a que lo permitido es hasta el 5%.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Contrastación de la hipótesis con resultados

En la etapa de desproteínezación se redujo las proteínas de 0,72% a 0,5%, debido a que se calentó el suero de la leche a 93°C lo cual ayudó a una mayor coagulación de las proteínas. De no haber realizado el acondicionamiento del suero de la leche se hubiera obtenido 38.61 g/L de ácido láctico, cantidad que es mucho menor a lo que se obtuvo finalmente con el acondicionamiento.

Se realizó la selección del *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* ya que el *Lactobacillus bulgaricus* es una bacteria homofermentativa que quiere decir que tienen un solo producto que es el ácido láctico y también por que estas dos bacterias realizan una simbiosis en la cual se dará un ambiente favorable para la producción de ácido láctico ya que al inicio de la fermentación el *Streptococcus thermophilus* da las condiciones favorables de producción de CO₂ y ácido fórmico para el crecimiento del *Lactobacillus bulgaricus*.

Se observaron en la fermentación tiempos entre 76 h y 52 h como máximo y mínimo. Se observó en las graficas de crecimiento celular que a 40°C y a las tres concentraciones trabajadas, hay un

crecimiento más acelerado llegando más rápido a la fase estacionario, esto es un indicativo que hay mayor consumo de sustrato (lactosa) y mayor producción de ácido láctico en menor tiempo.

La optimización del proceso se dió a una temperatura de 42°C, una concentración de 0,1 g/L y un pH de 6,0; estos parámetros óptimos se obtuvieron a través del diseño Box-Behnken, que opera con 30 pruebas experimentales. Una variable que tenga un $P > 0,05$ no tiene significancia en el proceso, por ello se concluyó que los factores más importantes fueron la concentración del inóculo y la temperatura; debido a que estos parámetros influyen directamente en el proceso de fermentación ($P = 0,0$), el pH es una variable poco influyente en la optimización ya que se obtuvo un valor de $P = 0,196$.

Se obtuvo un coeficiente de correlación 78.55 % lo cual es un indicativo que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos experimentales, según Humberto Gutiérrez para que el modelo tenga validez el coeficiente de correlación tiene que ser mayor al 70%.

Se logró un rendimiento de 85,20% de la conversión de lactosa a ácido láctico, esto se debió al acondicionamiento del suero de la

leche mediante la desproteínezación, la filtración y la suplementación del suero.

6.2 Contratación de resultados con otros estudios similares

A continuación se detalla los resultados de 3 estudios de obtención de ácido láctico:

En el estudio de “PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL LACTOSUERO UTILIZANDO LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS Y STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS” (Adriana Rojas. 2015.) obtuvieron 36,7 g/L. de ácido láctico a una temperatura de 40 °C y un pH entre 6,26 – 6,30.

En el estudio de “PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE SUERO DE LECHE, UTILIZANDO Lactobacillus helveticus EN CULTIVO CONTINUO” obtuvieron 13,02 g/L. de ácido láctico, esto lo realizaron a una temperatura de 40 °C sin medir el pH.

En el estudio de “OBTENCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR FERMENTACIÓN DE SUBPRODUCTOS LÁCTEOS”, (Tuero, 2013) obtuvieron 25,9 g/L de ácido láctico a unos parámetro de operación de 37°C y 6,5 de PH.

TABLA N° 6.1

COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON ANTECEDENTES

ESTUDIO	ÁCIDO LÁCTICO (g/L)	VARIABLES		MICROORGANISMO
		pH	T (°C)	
“optimización de los parámetros de fermentación del suero de la leche para la obtención del ácido láctico con la metodología de superficie de respuestas”	41,5	6,0	42	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
“producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> ” (adriana rojas. 2015.)	36,7	6,26 – 6,30	40	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
“producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando <i>Lactobacillus helveticus</i> en cultivo continuo”	13,0	-	40	<i>Lactobacillus helveticus</i>
“obtención de ácidos orgánicos por fermentación de subproductos lácteos”, (tuero, 2013)	25,9	6,5	37	<i>Lactobacillus casei</i>

Fuente: *Elaboración Propia*

Como se puede observar en la presenta investigación se ha obtenido una cantidad mayor de ácido láctico lo cual evidencia que al acondicionamiento de la materia prima con el proceso de desproteinización y filtración, para luego suplementar el suero de la leche con fosfato de amonio y extracto de levadura permite uan mayor conversión de la lactosa y agregando a ello el proceso de optimización de los parámetros de fermentación con el diseño Box-Benhken se logró obtener una mayor cantidad de ácido láctico, siendo este de 41,498 g/L a una concentración del inóculo a 0,1 g/L, una temperatura de 42°C y un pH de 6,0;

VII. CONCLUSIONES

- Se realizó el acondicionamiento de la materia prima con la finalidad de disminuir los sólidos totales y el porcentaje de proteína del suero de la leche de 0.72% a 0.5%, para esto se se filtraron los sólidos totales con un medio filtrante (papel filtro N° 393) que nos permitió obtener partículas menores a 155 mm, este acondicionamiento de la materia prima ayudó a la suplementación del suero de la leche con fosfato de amonio y extracto de levadura, que tiene como fin aumentar la conversión de lactosa a ácido láctico, obteniendo finalmente 41.49 g/L de ácido láctico.
- Los valores óptimos del proceso de fermentación se obtuvieron a una temperatura de 42°C, una concentración de inóculo de 0,1 g/L y pH 6,0 con lo cual se logró una concentración de ácido láctico igual a 41.498 g/L, con un rendimiento de 85,20 % de conversión de lactosa a ácido láctico.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la investigación de la optimización del proceso de fermentación con otras bacterias lácticas homofermentativas ya que la combinación de dos o tres de estas bacterias, podrían producir en mayor cantidad el ácido láctico.

- Se recomienda el estudio del proceso de fermentación utilizando otros suplementos para el suero de la leche ya que esto podría mejorar el crecimiento bacteriano y como consecuencia aumentar la conversión de lactosa a ácido láctico.

- Como un estudio posterior, se recomienda estudiar los parámetros óptimos de polimerización de ácido láctico para la obtención de ácido poliláctico, que en la actualidad ha elevado su demanda debido a su uso en la producción de bolsas biodegradables.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABDEL-RAHMAN MOHAMED, TASHIRO YUKIHIRO Y SONOMOTO, KENJI. **Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes**, *Biotechnol*, pp. 877 – 902. 2013.
2. AJILA NATHALY. **Diseño de la Línea de Producción de un Postre de Yogurt Descremado**. Tesis para obtención de título profesional. Ecuador. Escuela superior politécnica del litoral.2013.
3. AKERBERG CHRISTINA; HOFVENDAHL KARIN Y ZACCHI GUIDO. **Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by lactococcus lactics ATCC 19435 in whole- wheat flour**. *Applied mibrobiology and biotechnology* 49. 1998.
4. ALDADE SARA, ARAMENDÍA PEDRO, BONAZZOLA CECILIA Y LACREU LAURA. **Química 2 química en acción**. Buenos Aires. Editorial Colihue. 2004.

5. CLAVIJO ALFONSO. **Fundamentos de química analítica: equilibrio iónico y análisis químico.** Colombia. editorial UNIBIBLOS. 2002.

6. DE LOS ANGELES MARÍA. **Aislamiento y selección de cepas del género lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora.** Tesis doctoral. España. Universidad autónoma de Barcelona .2009.

7. DEL ÁNGEL DEYANIRA. **Estudio y síntesis en la producción de Ácido Poliláctico (APL). [Tesis de Maestría en tecnología avanzada].** México D.F, México: Instituto Politécnico Nacional. 2007.

8. DEL CASTILLO ROSER. **Productos lácteos: tecnología.** España. Editorial Barcelona: UPC. Primera edición. 2004.

9. DORIAN PAULINE. **Principios de ingeniería de los bioprocesos.** España. Editorial acriba. Primera edición.1998.

10. FOEGEDING ALLEN Y LUCK PAIGE. **Whey protein products.** 1957-1960.In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.).

Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition. Academic Press, New York. 2002.

11.FREIFELDER DAVID. Técnicas de bioquímica y biología molecular. España. Editorial reverté. 2003.

12.GIL RICARDO, DOMÍNGUEZ ROSA Y PACHO JUAN. Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. Tecnología y Ciencia Ed. (IMIQ), vol. 23 núm.2. 2008.

13.HOFVENDAHL KARIN Y HAGERDAL BARBEL. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and microbial technology 26. 2000.

14.HAROLD WALTON Y JORGE REYES. Análisis Químico e instrumental moderno. España. Editorial reverté. 2005.

15.DUPONT DURST Y GEORGE GOKEI. Química orgánica experimental. España. Editorial Reverté. 2007.

16.JELEN, P. 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.2003

17. RAMIREZ JUAN. **Diseño de procesos en Industria Láctea: Transformación de lactosuero.** Universidad central del Ecuador. Investigación aplicada a la ingeniería de procesos. 2013.
18. SERNA LILIANA Y RODRÍGUEZ AIDA. **Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte.** Paper de la sociedad mexicana de nutrición y tecnología de alimentos. 2005.
19. SERRANO YOLANDA. **Tipos de fermentación y aplicaciones industriales.** México. Editorial alfaomega. Primera edición. 2011.
20. TUERO SAÚL. **Obtención de ácidos orgánicos por fermentación de subproductos lácteos.** Tesis doctoral. España. Universidad de Oviedo .2013.
21. ACCOLAS J. **Características del metabolismo y bioquímica de las bacterias del yogurt.** Revista de ciencias lait. Vol 23-06. Francia .2000.
22. GARCÍA CARLOS. **Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando lactobacillus casei.** Revista de biotecnología en el sector agropecuario y industrial. Vol 11. Colombia. 2013.

23. GOMEZ G. J. Y C. NIETO. **Fermentaciones lácticas de hexosas y pentosas.** 2002. Disponible en: http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUS_QUIZA_FIPA/CAPITULO%20N%BA%2003%20F.pdf.
24. GUTIERREZ PULIDO HUMBETO, **Análisis y diseño de experimentos.** México. Editorial Mc Graw Hill. Tercera edición. 2012.
25. KLEEREBEZEM MICHIEL. **Secuencia complete del genoma para el lactobacillus plantarium.** Revista microbiológica .Vol. 150.11.EEUU. 2003.
26. LONDOÑO MARGARITA, SEPÚLVEDA JOSE, HERNÁNDEZ ALDO Y PARRA JAIME. **Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con lactobacillus casei.** Revista Facultad Nacional Agronomía. Edición 8. Colombia, 2008.
27. MUÑI AGNEL, PAEZ GISELA, FARÍA JOSE, FERRER JOSE Y RAMONES EDUARDO. **Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nano filtración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero,** Revista científica. Vol. XV-Nº 4. Colombia. 2005.

28. PANESAR PARMJIT, KENNEDY JHON, GANDHI DINA Y BUNKO KATARZYMA. **Bioutilisation of whey for lactic acid production.** **Food Chemistry.** Revista científica 105: 1-14. Inglaterra, 2007.
29. PARRA HUERTAS RICARDO ADOLFO. **Lactosuero: importancia en la industria de alimentos.** **Revista facultad nacional de agronomía.** Vol. 62. Colombia. 2009.
30. PUERTA QUINTERO GLORIA INÉS. **Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café .**Revista de agronomía. ISSN-0120-0179.Colombia.2010.
31. ROJAS ADRIANA, MONTAÑO LICETH Y BASTIDAS MARLON. **Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus y streptococcus thermophilus,** Rev. Colomb. Quim. Vol.44: 5 a 10. Colombia.2015.
32. SANCHEZ OSCAR. **Obtención de ácido cítrico a partir de suero de la leche por fermentación con Aspergillus spp.** Revista colombiana de biotecnología .Vol. 6 pág. 43-54 2004. Colombia. 2004.

33. URRIBARRI LAURIS, VIELMA ALEX, PÁEZ GISELA, FERRER JOSÉ, MÁRMOL ZULAY Y RAMONES EDUARDO. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando lactobacillus helveticus en cultivo continuo. Pág 297-302. Colombia .2004.

34. XIA LIU, CHUNG YOON, YANG SHANG Y YOUSEF AHMED. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized Lactococcus. Vol. 40 pág. 13-30. EEUU. 2004.

X. ANEXOS

10.1 Matriz de consistencia

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACION DE SUBPRODUCTOS LACTEOS PARA LA OBTENCION DEL ACIDO LACTICO						
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODO
<p>GENERAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo optimizar el proceso de fermentación del suero de la leche para la obtención de ácido láctico? <p>ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo acondicionar la materia prima y en que beneficia ello al crecimiento microbiano? ¿Cómo determinar los parámetros operacionales óptimos (Temperatura, concentración de inóculo Y pH) para la obtención del ácido láctico a partir del suero de la leche? ¿Cuál será el rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico? 	<p>GENERAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> Optimizar los parámetros de fermentación del suero de la leche para la obtención de ácido láctico <p>ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Encontrar el acondicionamiento adecuado de la materia prima y el medio para el crecimiento microbiano. Determinar los parámetros operacionales óptimos (Temperatura, concentración del inóculo y pH) para la obtención de ácido láctico a partir del suero de la leche. Determinar cuál será el rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico 	<p>GENERAL:</p> <p>La fermentación del suero de la leche, utilizando como inóculo el <i>Lactobacillus Bulgaricus</i> y el <i>Streptococcus thermophilus</i> a una temperatura de 41 °C, a una concentración de inóculo de 0,2 g/L y un pH de 5.5 se logrará obtener una conversión del 30% de lactosa a ácido láctico.</p> <p>ESPECIFICA :</p> <ul style="list-style-type: none"> Mediante la desproteínización y filtración de la materia prima se logrará mejorar la producción de ácido láctico y con el porcentaje de proteínas menores a 0,6 % del suero de la leche se logrará obtener un mejor medio para el crecimiento bacteriano. A una temperatura de 41°C, concentración de inóculo de 0,2 g/L y pH de 5,5 se logrará una mayor conversión de lactosa en ácido láctico. Mediante la optimización del proceso se logrará un 30 % de conversión de lactosa a ácido láctico. 	<p>Dependientes:</p> <p>Y= Rendimiento de la lactosa al producir ácido láctico.</p> <p>Independientes:</p> <p>X1 = Acondicionamiento de la materia prima y del medio para el crecimiento microbiano</p> <p>X2= Propiedades del suero de la leche (cantidad de lactosa, cantidad de proteínas y pH).</p> <p>X3= Parámetros operacionales (Temperatura, Concentración del inóculo y pH).</p>	<p>Dependientes:</p> <p>concentración</p> <p>Independientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Partículas en suspensión Acidez Cantidad de proteínas Cantidad de lactosa Temperatura Acidez Concentración de inóculo 	<p>Dependientes</p> <p>Rendimiento</p> <p>Independientes</p> <ul style="list-style-type: none"> Tamaño de malla pH g/mL g/mL °C pH g/mL 	<p>Dependientes:</p> <p><i>Espectrofotometría UV</i></p> <p>Independientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Filtración Potencimetría Método kjeldahl Método NMX-219-1979 Termómetro Potencimetría Dilución de soluciones

10.2 Folleto de la cepa: Dri-Set Bioflora 424 17802



	PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	DOSIFICACIÓN	PRECIO (S/.)
CULTIVOS DE YOGURT	Dri-Set Bioflora 424 17802	Yogurt probiótico		
	Dri-Set 438 17801	Yogurt batido	1 sobre rinde 100 L	
	Dri-Set 424 17798	Yogurt aplanado		
Edulcorantes	Flavor Enhancer 20660	Mezcla equilibrada de aspartame, acesulfame y sacarina	1 g = 250 g de azúcar	
	Sucralosa 20603	Sucralosa en polvo	1 g = 600 g de azúcar	
	Steviamont 37195	Natural a base de stevia	1 g = 5 g de azúcar	
	Edulcorante SCA 29955	Natural a base de sucralosa	1 g = 10 g de azúcar	
Liquidulinas	Leche Descremada	Ingredientes básicos para la preparación de helados		
	Leche Entera			
Salsas Frutales	Topping de chocolate 32705	Salsa con frutas indicada para decorar y complementar el producto		
	Salsa de naranja 28000			
	Salsa de maracuyá 27834			
	Salsa de saúco 35543			
Materiales	Termómetro de vidrio 41820	-10/+150 °C		
	Termómetro de vidrio 41820	Con espiga de 20 cm. -50/+300 °C		
	Botellas de plástico para yogurt	De 500 ml y 1 L Colores de tapas: amarilla, blanca, naranja, roja, verde		
Desinfección y Limpieza	Sanigel	Gel antibacterial para manos	1 pump	
	Saniquat	Amonio cuaternario - Desinfectante que actúa sobre bacterias, hongos, virus y algas	1 ml /L	
	Mascarilla de 3 pliegues con amarras			
	Gorro tipo acordeón	Caja x 100 unidades		
	Gorro tipo acordeón			

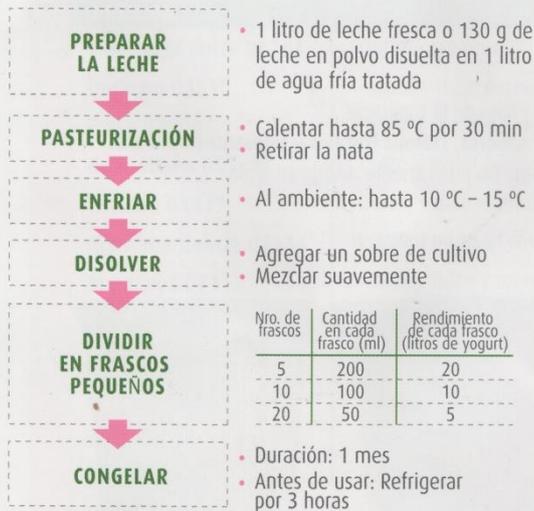
TIPOS DE YOGURT

TIPO	TEXTURA	SÓLIDOS TOTALES	CULTIVO
Bebible	Líquida	11 - 12% (proviene de la leche)*	Dri-set 438 ó Probiótico Bioflora
Batido	Cremosa	13 - 14% Adicionar leche en polvo. (10 - 20 g/L de leche fresca)	Vivolac Dri-set 438 ó Probiótico Bioflora
Aflanado	Firme	14 - 15% Adicionar leche en polvo. (20 - 30 g/L de leche fresca)	Vivolac Dri-set 424 ó Probiótico Bioflora

*Leche fresca de vaca tiene 10 - 12% de sólidos

DIVISIÓN DE LOS CULTIVOS DE YOGURT

Para preparar menos de 100 litros de yogurt



ELABORACIÓN DE YOGURT BATIDO

Rendimiento: 100 litros de yogurt

INGREDIENTES:

Leche	Entera en polvo: 13.5 kg Fresca: 100 L
Azúcar blanca	8 kg Se puede reemplazar con edulcorante
Cultivo Vivolac	1 sobre
Sabor	Esencia o crema frutal: según dosificación
Colorantes	Solo naturales: según dosificación
Estabilizante	Según dosificación
Preservante	50 g

10.3 Tabla de conversión de lactosa

TABLAS PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES SEGUN FEHLING												
1) CU ₂ O		2) GLUCOSA		3) AZUCARES INVERTIDOS			4) SACAROSA					
5) HIDRATO DE LACTOSA						6) HIDRATO DE MALTOSA						
Cu ₂ O	G	A. I.	%	L.	M.	Cu ₂ O	G	A. I.	%	L.	M.	
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
10	5.6	4.6	4.4	5.1	6.8	55	25.3	25.3	24.0	34.3	45.5	
11	6.0	5.1	4.8	5.8	7.7	56	25.7	25.8	24.5	34.9	46.4	
12	6.4	5.6	5.3	6.4	8.5	57	26.2	26.2	24.9	35.6	47.2	
13	6.8	6.0	5.7	7.1	9.4	58	26.6	26.7	25.3	36.2	48.1	
14	7.2	6.4	6.1	7.7	10.2	59	27.1	27.2	25.7	36.9	48.9	
15	7.7	6.9	6.6	8.4	11.1	60	27.5	27.6	26.1	37.5	49.8	
16	8.1	7.3	6.9	9.0	12.0	61	27.9	28.1	26.6	38.2	50.7	
17	8.6	7.8	7.4	9.7	12.8	62	28.4	28.6	27.0	38.8	51.5	
18	9.0	8.3	7.9	10.3	13.7	63	28.8	29.0	27.4	39.4	52.4	
19	9.5	8.7	8.3	11.0	14.5	64	29.2	29.5	27.9	40.1	53.2	
20	9.9	9.2	8.7	11.6	15.4	65	29.7	30.0	28.4	40.8	54.1	
21	10.4	9.6	9.1	12.3	16.3	66	30.1	30.4	28.8	41.4	54.9	
22	10.8	10.0	9.5	12.9	17.1	67	30.6	30.9	29.3	42.0	55.8	
23	11.2	10.5	10.0	13.6	18.0	68	31.0	31.4	29.7	42.7	56.6	
24	11.7	11.0	10.5	14.2	18.8	69	31.4	31.8	30.1	43.3	57.5	
25	12.1	11.4	10.9	14.8	19.7	70	31.9	32.3	30.5	44.0	58.3	
26	12.5	11.9	11.3	15.5	20.6	71	32.3	32.7	31.0	44.6	59.1	
27	13.0	12.4	11.8	16.2	21.4	72	32.8	33.1	31.4	45.3	60.0	
28	13.4	12.8	12.2	16.8	22.3	73	33.2	33.6	31.8	45.9	60.8	
29	13.9	13.3	12.6	17.5	23.1	74	33.7	34.1	32.3	46.6	61.7	
30	14.3	13.7	13.0	18.1	24.0	75	34.1	34.5	32.7	47.2	62.5	
31	14.8	14.2	13.5	18.7	24.9	76	34.5	35.0	33.1	47.9	63.4	
32	15.2	14.7	13.9	19.4	25.7	77	35.0	35.5	33.6	48.5	64.2	
33	15.6	15.1	14.3	20.0	26.6	78	35.4	35.9	34.0	49.2	65.1	
34	16.1	15.6	14.8	20.7	27.4	79	35.9	36.4	34.5	49.8	65.9	
35	16.5	16.1	15.3	21.3	28.3	80	36.3	36.8	34.9	50.4	66.8	
36	16.9	16.5	15.7	22.0	29.2	81	36.8	37.3	35.3	51.1	67.7	
37	17.4	17.0	16.1	22.6	30.0	82	37.2	37.8	35.8	51.8	68.5	
38	17.8	17.4	16.5	23.3	30.9	83	37.6	38.2	36.2	52.4	69.4	
39	18.3	17.9	17.0	23.9	31.7	84	38.1	38.7	36.7	53.1	70.2	
40	18.7	18.4	17.5	24.6	32.6	85	38.5	39.2	37.2	53.7	71.1	
41	19.2	18.8	17.9	25.2	33.5	86	39.0	39.7	37.6	54.4	72.0	
42	19.5	19.3	18.3	25.9	34.3	87	39.4	40.2	38.1	55.0	72.8	
43	20.0	19.8	18.8	26.5	35.2	88	39.8	40.6	38.5	55.7	73.7	
44	20.4	20.2	19.2	27.2	36.0	89	40.3	41.1	38.9	56.3	74.5	
45	20.9	20.7	19.7	27.8	36.9	90	40.7	41.6	39.4	57.0	75.4	
46	21.3	21.1	20.0	28.5	37.8	91	41.2	42.0	39.8	57.6	76.3	
47	21.4	21.6	20.5	29.1	38.6	92	41.6	42.5	40.3	58.2	77.1	
48	22.2	22.1	21.0	29.8	39.5	93	42.1	43.0	40.8	58.9	78.0	
49	22.5	22.5	21.4	30.4	40.3	94	42.6	43.5	41.2	59.5	78.8	
50	23.3	23.0	21.9	31.1	41.2	95	43.0	43.9	41.6	60.2	79.7	
51	23.5	23.5	22.3	31.7	42.1	96	43.4	44.4	42.1	60.8	80.5	
52	24.2	23.9	22.7	32.4	42.9	97	43.9	44.8	42.5	61.4	81.4	
53	24.4	24.4	23.2	33.0	43.8	98	44.3	45.3	42.9	62.1	82.3	
54	24.5	24.9	23.6	33.7	44.6	99	44.8	45.8	43.4	62.8	83.1	

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
100	45.2	46.3	43.9	63.4	84.0	150	67.8	69.8	66.2	96.2	126.4
101	45.7	46.7	44.3	64.0	84.9	151	68.2	70.3	66.7	96.9	127.3
102	46.1	47.2	44.7	64.6	85.7	152	68.7	70.8	67.2	97.6	128.1
103	46.6	47.6	45.1	65.3	86.6	153	69.2	71.2	67.5	98.2	129.0
104	47.0	48.0	45.6	66.0	87.4	154	69.6	71.7	68.0	98.8	129.8
105	47.5	48.5	46.0	66.6	88.3	155	70.0	72.2	68.5	99.5	130.7
106	47.9	49.0	46.5	67.2	89.1	156	70.5	72.7	69.0	100.2	131.5
107	48.4	49.5	46.9	67.9	90.0	157	71.0	73.2	69.4	100.8	132.4
108	48.8	49.9	47.3	68.6	90.8	158	71.4	73.6	69.8	101.5	133.2
109	49.3	50.4	47.8	69.2	91.7	159	71.9	74.1	70.3	102.2	134.1
110	49.7	50.9	48.3	69.9	92.5	160	72.3	74.6	70.8	102.8	134.9
111	50.2	51.4	48.7	70.5	93.3	161	72.8	75.1	71.2	103.5	135.7
112	50.6	51.8	49.1	71.2	94.2	162	73.2	75.5	71.6	104.2	136.6
113	51.1	52.3	49.6	71.9	95.0	163	73.7	76.0	72.1	104.9	137.4
114	51.5	52.8	50.1	72.5	95.9	164	74.2	76.5	72.6	105.6	138.3
115	52.0	53.2	50.4	73.2	96.7	165	74.6	76.9	73.0	106.2	139.1
116	52.4	53.7	50.9	73.8	97.6	166	75.1	77.4	73.5	106.9	140.0
117	52.9	54.2	51.5	74.5	98.4	167	75.6	77.9	73.9	107.6	140.8
118	53.3	54.7	51.9	75.1	99.3	168	76.0	78.4	74.4	108.2	141.7
119	53.8	55.2	52.3	75.8	100.1	169	76.5	78.9	74.9	108.9	142.5
120	54.2	55.7	52.8	76.5	101.0	170	77.0	79.4	75.3	109.6	143.4
121	54.7	56.1	53.2	77.1	101.9	171	77.4	79.9	75.8	110.2	144.3
122	55.1	56.5	53.6	77.7	102.7	172	77.9	80.4	76.3	110.9	145.1
123	55.6	57.0	54.1	78.4	103.6	173	78.3	80.9	76.8	111.6	146.0
124	56.0	57.5	54.5	79.1	104.4	174	78.8	81.4	77.2	112.3	146.8
125	56.5	58.0	55.0	79.8	105.3	175	79.3	81.9	77.7	113.0	147.7
126	56.9	58.5	55.5	80.4	106.1	176	79.7	82.4	78.2	113.6	148.6
127	57.4	59.0	55.9	81.0	107.0	177	80.2	82.8	78.6	114.3	149.4
128	57.8	59.4	56.3	81.7	107.8	178	80.7	83.3	79.0	115.0	150.3
129	58.3	59.9	56.8	82.3	108.7	179	81.1	83.8	79.5	115.6	151.1
130	58.7	60.3	57.2	83.0	109.5	180	81.6	84.3	80.0	116.3	152.0
131	59.2	60.8	57.7	83.7	110.3	181	82.1	84.7	80.4	117.0	152.9
132	59.6	61.3	58.1	84.4	111.2	182	82.5	85.2	80.8	117.6	153.7
133	60.1	61.8	58.6	85.0	112.0	183	82.9	85.7	81.3	118.3	154.6
134	60.5	62.3	59.1	85.6	112.9	184	83.4	86.2	81.8	119.0	155.4
135	61.0	62.7	59.5	86.3	113.7	185	83.9	86.6	82.2	119.7	156.3
136	61.5	63.2	59.9	87.0	114.6	186	84.4	87.1	82.6	120.3	157.1
137	61.9	63.7	60.4	87.7	115.4	187	84.8	87.6	83.1	121.0	158.0
138	62.4	64.1	60.8	88.3	116.3	188	85.3	88.1	83.6	121.7	158.8
139	62.8	64.6	61.3	89.0	117.1	189	85.7	88.5	84.0	122.4	159.7
140	63.3	65.1	61.7	89.6	118.0	190	86.2	89.0	84.5	123.0	160.5
141	63.7	65.6	62.2	90.3	118.8	191	86.6	89.5	84.9	123.7	161.3
142	64.2	66.0	62.6	91.0	119.7	192	87.1	90.0	85.4	124.3	162.2
143	64.6	66.5	63.1	91.6	120.5	193	87.6	90.4	85.8	125.0	163.0
144	65.0	67.0	63.6	92.2	121.4	194	88.0	90.9	86.3	125.6	163.9
145	65.5	67.5	64.0	92.9	122.2	195	88.5	91.4	86.7	126.3	164.7
146	66.0	67.9	64.4	93.6	123.0	196	88.9	91.9	87.2	127.0	165.6
147	66.4	68.4	64.9	94.3	123.9	197	89.4	92.3	87.6	127.7	166.4
148	66.9	68.9	65.4	94.9	124.7	198	89.9	92.8	88.1	128.4	167.3
149	67.4	69.3	65.8	95.6	125.6	199	90.3	93.3	88.5	129.1	168.1

Cu ₂ O	A. I.	Zc.	L.	W.	Cu ₂ O	A. I.	Zc.	L.	W.		
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
mg.	mg.	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
200	90.8	93.8	89.0	129.7	169.0	250	114.2	118.7	112.8	163.4	211.5
201	91.3	94.2	89.4	130.4	169.9	251	114.7	119.2	113.2	164.0	212.3
202	91.7	94.6	89.9	131.1	170.7	252	115.2	119.7	113.7	164.7	213.2
203	92.2	95.2	90.3	131.8	171.6	253	115.6	120.2	114.2	165.4	214.0
204	92.7	95.7	90.8	132.4	172.4	254	116.1	120.7	114.7	166.0	214.9
205	93.2	96.2	91.3	133.1	173.3	255	116.6	121.2	115.1	166.7	215.7
206	93.6	96.6	91.7	133.8	174.1	256	117.0	121.7	115.6	167.3	216.6
207	94.1	97.1	92.1	134.5	175.0	257	117.5	122.2	116.1	168.0	217.4
208	94.5	97.6	92.6	135.2	175.8	258	118.0	122.7	116.6	168.7	218.3
209	95.0	98.1	93.1	135.8	176.7	259	118.5	123.2	117.0	169.4	219.1
210	95.5	98.6	93.6	136.5	177.5	260	119.0	123.7	117.5	170.0	220.0
211	95.9	99.1	94.0	137.2	178.3	261	119.4	124.2	118.0	170.7	220.9
212	96.4	99.6	94.5	137.9	179.2	262	119.9	124.7	118.5	171.3	221.7
213	96.9	100.1	95.0	138.6	180.0	263	120.4	125.2	118.9	172.0	222.6
214	97.4	100.6	95.5	139.3	180.9	264	120.9	125.7	119.4	172.6	223.4
215	97.8	101.1	96.0	140.0	181.7	265	121.4	126.2	119.9	173.3	224.3
216	98.3	101.6	96.5	140.6	182.6	266	121.8	126.7	120.4	174.0	225.1
217	98.7	102.1	97.0	141.3	183.4	267	122.3	127.2	120.9	174.7	226.0
218	99.2	102.6	97.5	142.0	184.3	268	122.8	127.8	121.4	175.4	226.8
219	99.7	103.1	97.9	142.6	185.1	269	123.3	128.3	121.9	176.1	227.7
220	100.1	103.6	98.4	143.3	186.0	270	123.7	128.8	122.4	176.8	228.5
221	100.6	104.1	98.9	144.0	186.9	271	124.2	129.3	122.8	177.5	229.3
222	101.1	104.6	99.4	144.7	187.7	272	124.7	129.8	123.3	178.2	230.2
223	101.5	105.1	99.8	145.4	188.6	273	125.2	130.3	123.8	178.8	231.0
224	102.0	105.6	100.3	146.1	189.4	274	125.6	130.8	124.3	179.5	231.9
225	102.5	106.1	100.8	146.8	190.3	275	126.1	131.3	124.7	180.2	232.7
226	103.0	106.6	101.3	147.5	191.1	276	126.6	131.8	125.2	180.9	233.6
227	103.5	107.1	101.7	148.1	192.0	277	127.1	132.3	125.7	181.6	234.4
228	103.9	107.6	102.2	148.8	192.8	278	127.6	132.8	126.2	182.3	235.3
229	104.4	108.1	102.7	149.4	193.7	279	128.0	133.3	126.7	183.0	236.1
230	104.8	108.6	103.2	150.1	194.5	280	128.5	133.8	127.2	183.6	237.0
231	105.1	109.1	103.6	150.8	195.3	281	129.0	134.4	127.7	184.3	237.9
232	105.8	109.6	104.1	151.4	196.2	282	129.4	134.9	128.2	185.0	238.7
233	106.3	110.1	104.6	152.1	197.0	283	129.9	135.4	128.6	185.7	239.6
234	106.8	110.6	105.1	152.8	197.9	284	130.4	135.9	129.1	186.4	240.4
235	107.1	111.1	105.5	153.4	198.7	285	130.8	136.4	129.6	187.1	241.3
236	107.7	111.6	106.0	154.1	199.6	286	131.3	136.9	130.1	187.8	242.2
237	108.2	112.1	106.5	154.8	200.4	287	131.8	137.4	130.5	188.5	243.0
238	108.6	112.6	107.0	155.4	201.3	288	132.3	137.9	131.0	189.1	243.9
239	109.1	113.1	107.5	156.1	202.1	289	132.8	138.4	131.5	189.8	244.7
240	109.5	113.6	108.0	156.8	203.0	290	133.2	138.9	132.0	190.5	245.6
241	110.0	114.2	108.5	157.4	203.9	291	133.7	139.4	132.5	191.2	246.5
242	110.5	114.7	109.0	158.1	204.7	292	134.2	140.0	133.0	191.9	247.3
243	111.0	115.2	109.4	158.7	205.6	293	134.7	140.5	133.5	192.6	248.2
244	111.4	115.7	109.9	159.4	206.4	294	135.2	141.0	134.0	193.3	249.0
245	111.9	116.2	110.4	160.1	207.3	295	135.6	141.5	134.4	194.0	249.9
246	112.4	116.7	110.9	160.7	208.1	296	136.1	142.0	134.9	194.7	250.8
247	112.8	117.2	111.3	161.4	209.9	297	136.6	142.5	135.4	195.4	251.6
248	113.3	117.7	111.8	162.0	209.8	298	137.1	143.0	135.9	196.0	252.5
249	113.8	118.2	112.3	162.7	210.7	299	137.6	143.5	136.3	196.7	253.3

10.4 Procesos unitarios y parte experimental

a) Recolección y acondicionamiento del suero de la leche.

1.- Recolección



2.- Acondicionamiento



Desproteínización



Pre - filtrado



Filtrado al vacío

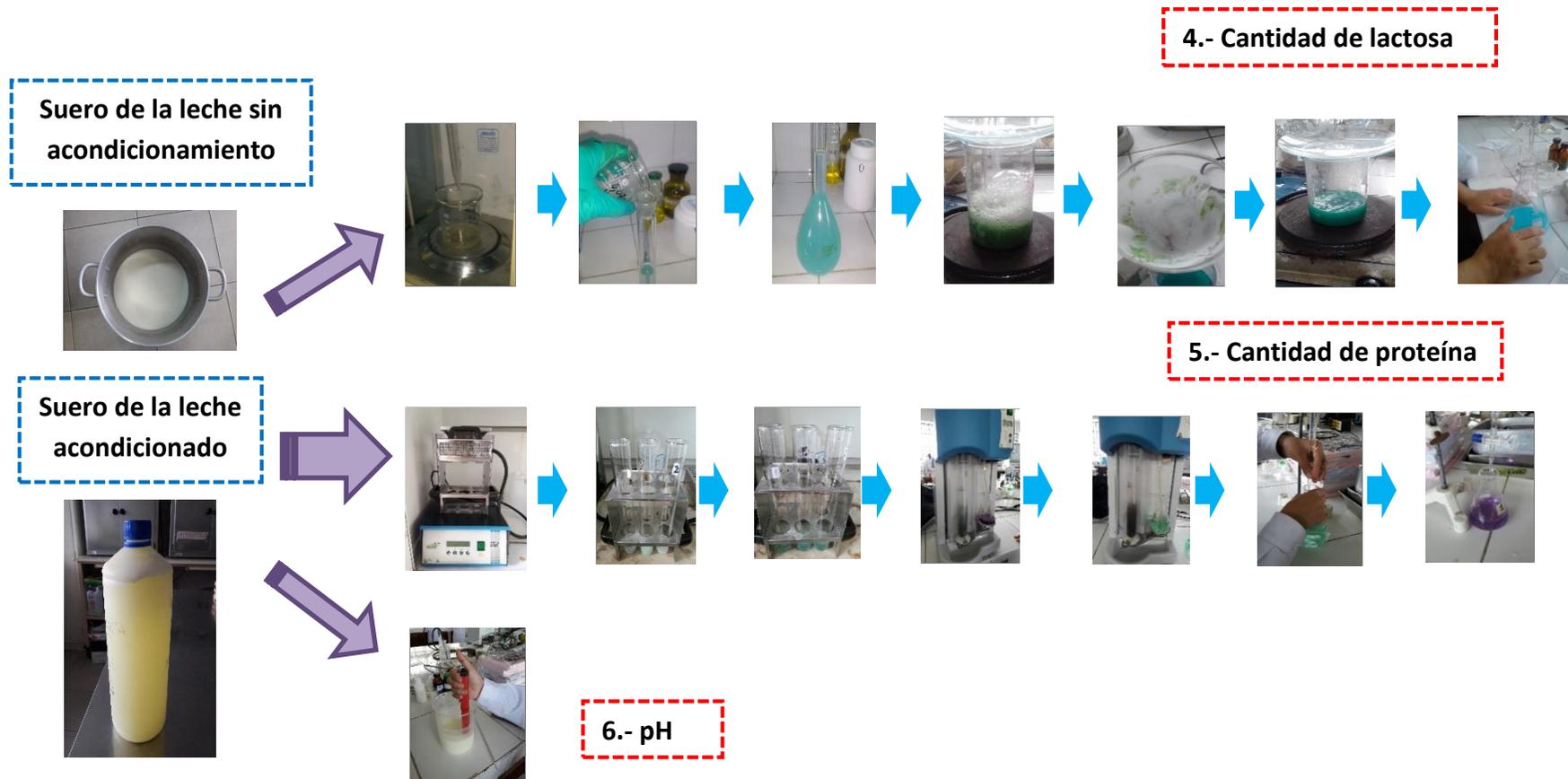


Esterilización

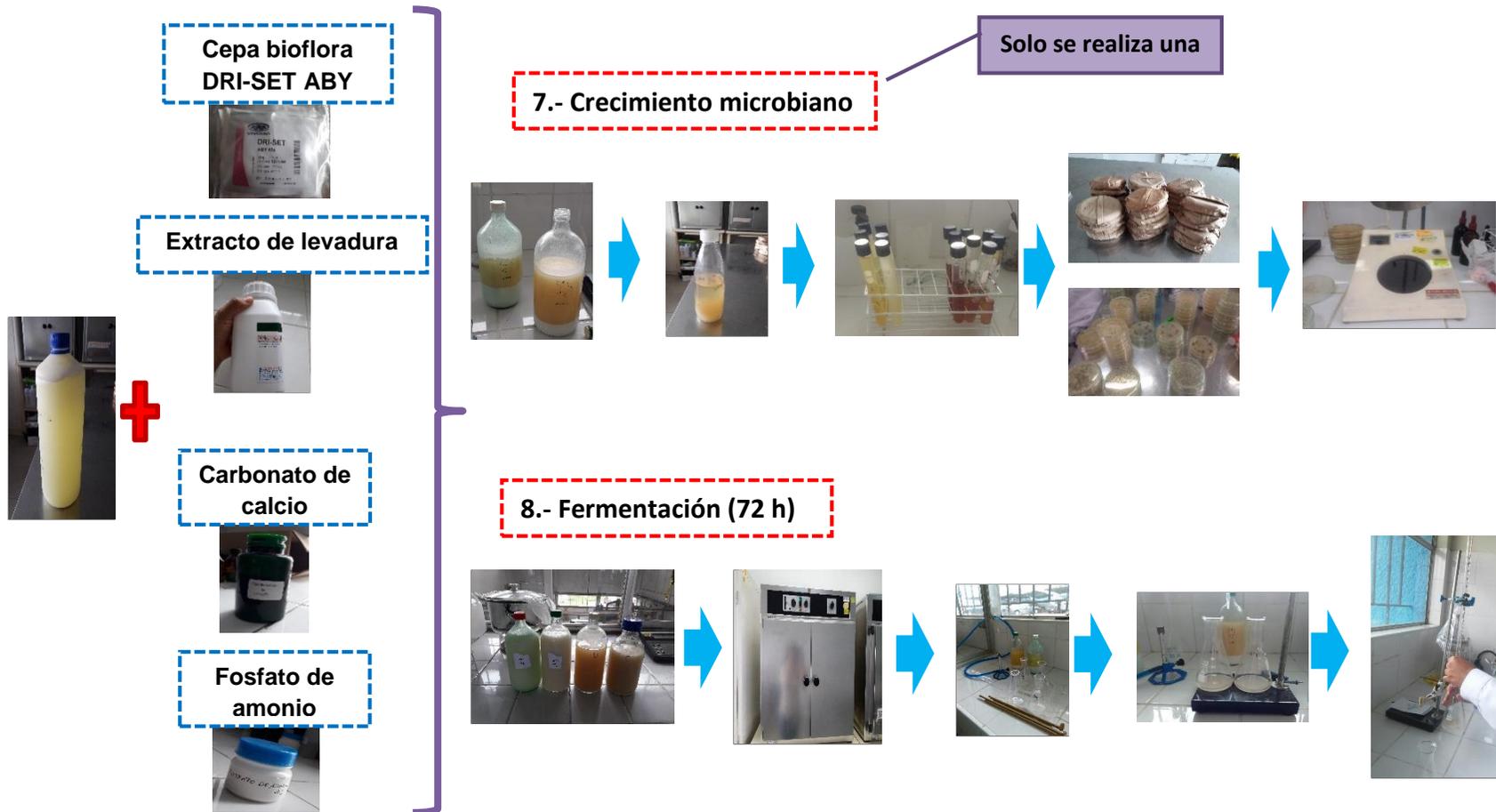


Suero de la leche

b) Caracterización del suero de la leche.

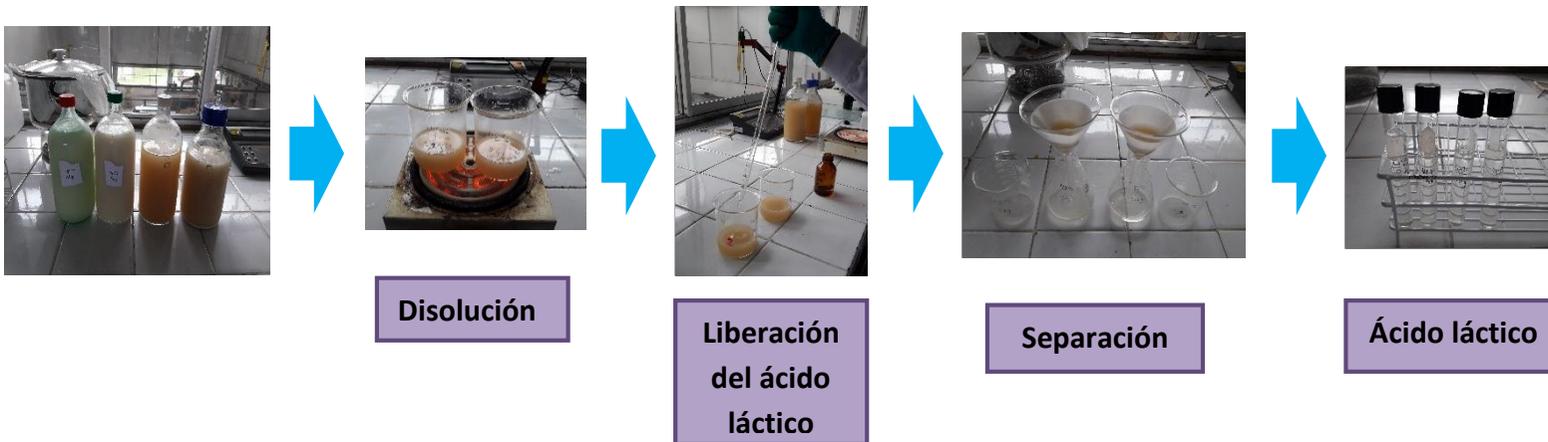


c) Fermentación del suero de la leche.



d) Extracción del ácido láctico

9.- Extracción del ácido láctico



e) Reconocimiento y caracterización del ácido láctico.

10.- Reconocimiento del ácido láctico



Patrón



Muestras



Espectrómetro infrarrojo
FTIR shimadzu 8400S

11.-Caracterización del ácido láctico

Concentración del ácido láctico



Curva patrón



Muestras



Espectrofotómetro
UV varían Cary 50

f) Reactivos utilizados.



Ácido bórico



Ácido clorhídrico



Ácido láctico



Ácido nítrico



Ácido sulfúrico



Almidón



Carbonato de calcio



Extracto de levadura



Fosfato de amonio



Hidróxido de sodio



Indicador tashiro



Sulfato de cobre



Sulfato de potasio



Sal de seignette



Tiosulfato de sodio



Urea



Yoduro de potasio

