



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN  
DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE LACTOSUERO**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL**

**Autores: Ronnie Francisco Mora Lozano  
Cristian Israel Bravo Ruiz**

**Directora: Dra. Lucía Yépez Vásquez**

**Ibarra-Ecuador  
2014**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN  
DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE LACTOSUERO

Tesis revisada por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como requisito  
parcial para obtener el título de:

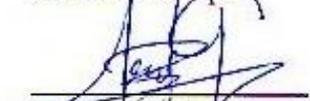
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA:



Dra. Lucía Yépez

DIRECTORA



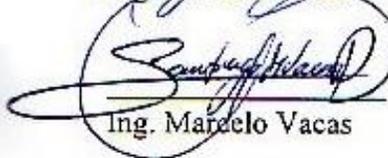
Ing. Jimmy Cuarán

ASESOR



Ing. Carlos Paredes

ASESOR



Ing. Marcelo Vacas

ASESOR

## DECLARACIÓN

Manifestamos que la presente obra es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto es original y que somos los titulares de los derechos patrimoniales; por lo que asumimos la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldremos en defensa de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación por parte de terceros.

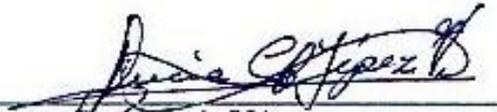
Ibarra, a los 9 días del mes de Octubre de 2014

  
Ronnie Francisco Mora Lozano

  
Cristian Israel Bravo Ruiz

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Ronnie Francisco Mora Lozano y Cristian Israel Bravo Ruiz, bajo mi supervisión.



---

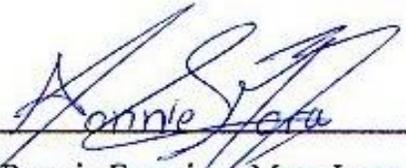
Dra. Lucía Yépez

**DIRECTORA DE TESIS**

## **CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, Mora Lozano Ronnie Francisco, con cédula de identidad Nro. 100233209-4, y Bravo Ruiz Cristian Israel, con cédula de identidad Nro. 100381840-6, manifestamos nuestra voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autores de la obra o trabajo de grado denominado: **OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE LACTOSUERO**, que ha sido desarrollado para optar por el título de: **INGENIEROS AGROINDUSTRIALES** en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 9 días del mes de Octubre de 2014

  
Ronnie Francisco Mora Lozano

  
Cristian Israel Bravo Ruiz

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD**  
**TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>		
	<b>INVESTIGADOR 1</b>	<b>INVESTIGADOR 2</b>
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD</b>	100381840-6	100233209-4
<b>NOMBRES Y APELLIDOS</b>	CRISTIAN ISRAEL BRAVO RUIZ	RONNIE FRANCISCO MORA LOZANO
<b>DIRECCIÓN</b>	NATABUELA	YACUCALLE
<b>EMAIL</b>	<a href="mailto:cristianisrael@ymail.com">cristianisrael@ymail.com</a>	<a href="mailto:rofrank13@yahoo.com">rofrank13@yahoo.com</a>
<b>TELÉFONO FIJO</b>	062 535019	062 585510
<b>TELÉFONO MÓVIL</b>	593 984442188	593 92982524
<b>DATOS DE LA OBRA</b>		
<b>TÍTULO</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE LACTOSUERO</b>	
<b>AUTORES</b>	CRISTIAN ISRAEL BRAVO RUIZ	RONNIE FRANCISCO MORA LOZANO
<b>FECHA</b>	2014/Octubre/09	
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA</b>	INGENIERO AGROINDUSTRIAL	
<b>DIRECTORA</b>	Dra. Lucía Yépez	

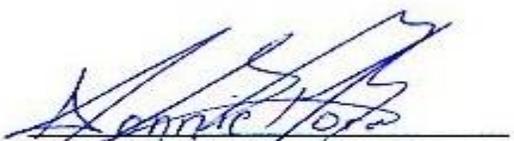
## 2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Nosotros, Mora Lozano Ronnie Francisco , con cédula de identidad No. 100233209-4, y Bravo Ruiz Cristian Israel, con cédula de identidad No. 100381840-6, en calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hacemos la entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

## 3. CONSTANCIAS

Los autores manifiestan que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es la titular de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 9 días del mes de Octubre de 2014



Ronnie Francisco Mora Lozano

CC: 100233209-4

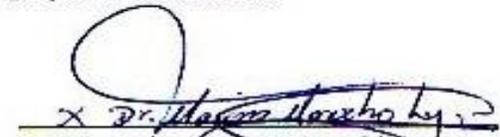
**AUTORES:**



Cristian Israel Bravo Ruiz

CC: 100381840-6

**ACEPTACIÓN:**



Nombre: Ing. Betty Chávez  
Cargo: JEFE DE BIBLIOTECA

Facultado por resolución de Consejo Universitario

## **AGRADECIMIENTO**

Es un largo recorrido en mundos desconocidos, donde nos hemos encontrado con seres muy agradables, nunca podríamos dar valor al cariño y comprensión de todas estas personas, que siempre las llevaremos en nuestra mente.

Agradecemos a la **Universidad Técnica del Norte**, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, por habernos permitido obtener nuestra formación profesional.

A la **Dra. Lucía Yépez**, Directora de Tesis, gracias por su paciencia, sus consejos y su apoyo incondicional.

A nuestros profesores **Dr. José Luis Moreno, Ingenieros Jimmy Curarán, Marcelo Vacas, Carlos Paredes**, quienes nos orientaron de manera desinteresada y acertada, en el desarrollo del trabajo de grado.

**Amigos, profesores, familiares y demás**, que contribuyeron de manera directa e indirecta para la realización de este proyecto, gracias por brindarnos su apoyo durante nuestro periodo estudiantil, ya que la culminación de esta etapa de nuestra vida no sería la misma, gracias a ello permitieron cumplir de manera exitosa nuestra formación profesional.

Por todos ellos nuestra fraterna gratitud.

**Los Autores**

## DEDICATORIA

A **Dios**, el principio y el fin de todos mis propósitos, por hacerme ver las maravillas de la vida, estar siempre conmigo y darme la bendición de estar vivo.

A mi padre **Ruffo Mora**, por ser más que padre un amigo que siempre ha creído en mí y ha estado a la vanguardia de mi éxito, y por enseñarme que en la vida todo logro con esfuerzo a la final tiene una gran recompensa.

A mi madre **Juana Lozano**, quien me ha forjado con muchos valores, y sobre todo por sus oraciones que me han sostenido cada vez que he tropezado, quiero que sepa que su presencia en mi vida es el regalo más grande que Dios me ha hecho, su apoyo incondicional, su cariño y comprensión me han llevado a ser la persona profesional que ahora soy.

A mis hermanas **Nidia y Alexandra**, quienes con sus consejos me han hecho crecer como persona, ayudándome a construir el principio de un camino lleno de glorias y triunfos.

De manera muy especial a la **Dra. Lucía Yépez**, quien creyó en mí antes que yo mismo sepa de lo que era capaz de lograr “alcanzar un triunfo con mis propias manos”, una persona que dentro de la vida universitaria se convirtió en parte de mi familia.

En fin a todos aquellos que me apoyaron dentro y fuera de la Universidad, para hacer posible la culminación de mi carrera profesional.

**Ronnie Mora**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación está dedicado a **Dios**, por permitirme llegar a cumplir una meta más en mi formación profesional.

A mi **madre**, por transformarse en un pilar fundamental en momentos de dificultades y victorias manifestando con su cariño y comprensión herramientas principales para mi formación personal.

A mi **padre y mis hermanos** quienes en todo momento supieron recordarme e inculcarme valores para entender que el éxito no llega por sí solo, sino con perseverancia y esfuerzo.

De igual forma dedico este trabajo de investigación a mis **abuelitos** a quienes quiero como padres por compartir momentos significativos además de estar siempre dispuestos a escucharme en todo momento.

**Cristian Bravo**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	viii
RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
GENERALIDADES .....	3
1.1 INTRODUCCIÓN .....	3
1.2 PROBLEMA .....	4
1.3 JUSTIFICACIÓN .....	5
1.4 OBJETIVOS .....	6
1.4.1 OBJETIVO GENERAL .....	6
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
1.5 HIPÓTESIS .....	6
2 MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 LACTOSUERO .....	7
2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL LACTOSUERO .....	8
2.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA .....	8
2.3 TIPOS DE LACTOSUERO .....	9
2.3.1 LACTOSUERO DULCE .....	9
2.3.2 LACTOSUERO ÁCIDO .....	9
2.4 FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO .....	10
2.5 LAS PROTEÍNAS .....	11

2.6	PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO .....	11
2.6.1	CONCENTRADOS DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE (CPSL).....	12
2.6.2	PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE AISLADAS Y PURIFICADAS.....	12
2.6.3	IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS DE LACTOSUERO.....	12
2.6.4	BENEFICIOS FUNCIONALES Y SENSORIALES.....	13
2.6.5	APLICACIONES .....	14
2.6.6	AMINOÁCIDOS PRESENTES EN EL SUERO DE LA LECHE.....	15
2.7	PROTEÍNA UNICELULAR .....	16
2.7.1	PORQUE PROTEÍNA UNICELULAR.....	16
2.7.2	PERSPECTIVAS ACTUALES DE LA PROTEÍNA UNICELULAR.....	17
2.8	AMINOÁCIDOS PRESENTES EN LA PROTEÍNA UNICELULAR .....	18
2.8.1	USOS DE LA BIOMASA Y PROTEÍNA UNICELULAR.....	18
2.9	LEVADURAS Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO .....	19
2.9.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
2.9.2	<i>Candida utilis</i> .....	21
2.9.3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	22
2.9.4	SELECCIÓN DE UN MICROORGANISMO.....	23
2.10	BIORREACTORES PARA LA FERMENTACIÓN.....	24
2.11	PRINCIPIOS DEL DISEÑO DE UN BIORREACTOR .....	24
2.11.1	OBJETIVOS PRINCIPALES DE LOS BIORREACTORES.....	25
2.11.2	BIORREACTORES MÁS UTILIZADOS A NIVEL DE LABORATORIO .....	26
2.11.3	EJEMPLOS DE BIORREACTORES A NIVEL DE LABORATORIO .....	27
2.12	DISEÑO EXPERIMENTAL 2 <sup>K</sup> .....	28
2.12.1	ILUSTRACIÓN GRÁFICA DEL DISEÑO 2 <sup>K</sup> .....	29

2.12.2	ANÁLISIS DEL DISEÑO FACTORIAL .....	29
2.12.3	REPRESENTACIÓN GEOMÉTRICA DE LOS CONTRASTES .....	30
2.12.4	MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTAL 2 <sup>3</sup> .....	31
2.12.5	ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	32
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1	EQUIPOS.....	33
3.2	MATERIALES .....	33
3.3	MATERIA PRIMA E INSUMOS .....	34
3.4	MÉTODOS .....	34
3.4.1	CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	34
3.5	DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	34
3.5.1	DISEÑO DEL PROYECTO.....	35
3.5.2	FACTORES Y NIVELES .....	35
3.6	PROCEDIMIENTO.....	36
3.6.1	SUERO DE QUESO UTILIZADO .....	36
3.6.2	TIPO DE LEVADURA Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO .....	36
3.6.3	EQUIPO DE FERMENTACIÓN.....	36
3.6.4	PRE TRATAMIENTO DEL LACTOSUERO.....	36
3.6.5	PROCESO DE FERMENTACIÓN .....	36
3.6.6	RENDIMIENTO DE LA BIOMASA .....	38
3.7	MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.....	39
3.7.1	DIAGRAMA OPERACIONAL DE PROCESO.....	39
4	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	41
4.1	BALANCE DE MATERIALES .....	41

4.1.1	COSTOS DE PRODUCCIÓN.....	42
4.2	RECuento TOTAL DE MICROORGANISMOS .....	43
4.3	DATOS DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS .....	59
4.3.1	EFFECTOS DE LA MATRIZ ( $2^3$ ).....	61
4.3.2	ESTIMACIÓN DE EFFECTOS PRINCIPALES .....	61
4.3.3	ESTIMACIÓN DE EFFECTOS PARA LAS INTERACCIONES .....	63
4.3.4	DIAGRAMA DE PARETO .....	65
4.3.5	ANÁLISIS DE VARIANZA.....	65
4.3.6	OPTIMIZACIÓN GRÁFICA DEL DISEÑO $2^3$ <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
4.3.7	SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	66
4.3.8	GRÁFICO DE CONTORNO .....	67
4.3.9	OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA .....	68
4.3.10	RESULTADO DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS .....	68
4.3.11	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE AGUA (HUMEDAD).....	68
4.3.12	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS .....	69
4.3.13	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.....	70
5	CONCLUSIONES.....	72
6	RECOMENDACIONES .....	74
7	BIBLIOGRAFÍA .....	75
8	ANEXOS .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición Química.....	8
Tabla 2. Tipos de suero.....	9
Tabla 3. Proteínas del lacto suero.....	11
Tabla 4. Aminoácidos presentes en el Lactosuero y Huevo en g/100g.....	15
Tabla 5. Perfil de aminoácidos en g/100g de proteína. ....	18
Tabla 6. Tipos de biorreactores .....	26
Tabla 7. Matriz de diseño experimental $2^3$ .....	31
Tabla 8. Ubicación del experimento.....	34
Tabla 9. Factores que influyen en el proyecto.....	35
Tabla 10. Tratamiento (1).....	43
Tabla 11. Tratamiento (a).....	45
Tabla 12. Tratamiento (b).....	47
Tabla 13. Tratamiento (ab).....	49
Tabla 14. Tratamiento (c).....	51
Tabla 15. Tratamiento (ac) .....	53
Tabla 16. Tratamiento (bc).....	55
Tabla 17. Tratamiento (abc) .....	57
Tabla 18. Datos del crecimiento de levaduras .....	59
Tabla 19. Respuestas del Experimento $2^3$ .....	60
Tabla 20. Análisis de varianza.....	66
Tabla 21. Puntos óptimos para la producción de proteína unicelular.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Usos del lacto suero .....	14
Figura 2. <i>Candida kefir</i> o <i>Utilis</i> .....	19
Figura 3. <i>Kluyveromyces marxianus</i> sp.....	19
Figura 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
Figura 5. Biorreactores en columna.....	27
Figura 6. Biorreactor estéril.....	27
Figura 7. Diseño factorial $2^3$ .....	29
Figura 8. Representación geométrica del diseño $2^3$ .....	30
Figura 9. Recuento en la cámara de Neubauer .....	37

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Tratamiento (1).....	44
Gráfico 2. Tratamiento (a).....	46
Gráfico 3. Tratamiento (b).....	48
Gráfico 4. Tratamiento (ab).....	50
Gráfico 5. Tratamiento (c).....	52
Gráfico 6. Tratamiento (ac).....	54
Gráfico 7. Tratamiento (bc).....	56
Gráfico 8. Tratamiento (abc).....	58
Gráfico 9. Efectos principales.....	62
Gráfico 10. Gráfico de interacciones.....	64
Gráfico 11. Diagrama de Pareto.....	65
Gráfico 12. Gráfica de puntos medios.....	66
Gráfico 13. Superficie de respuesta.....	67
Gráfico 14. Superficie de contorno.....	67

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE AGUA (HUMEDAD):.....	80
ANEXO B. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS .....	82
ANEXO C. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA .....	84
ANEXO D. PRUEBAS FÍSICO, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS.....	86
ANEXO E. FICHA TÉCNICA SULFATO DE AMÓNIO.....	89
ANEXO F. FICHA TÉCNICA ÁCIDO TRI CLORO ACÉTICO.....	91
ANEXO G. FOTOGRAFIAS.....	94
ANEXO H. ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	105

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo optimizar los parámetros para la producción de proteína unicelular a partir de lactosuero, logrando así que este desecho agroindustrial tenga un uso adecuado, evitando la contaminación ambiental en aquellas zonas donde es vertido, y a un futuro no muy lejano darle un valor agregado para el consumo animal y porque no decir que sea una fuente nutricional para el consumo humano.

El presente estudio prácticamente consistió en tres etapas:

- 1) Pre tratamiento del lactosuero: Etapa en donde se desproteinizó la materia prima adicionando Ácido tricloro Acético y posteriormente se llevó a una pasteurización.
- 2) Proceso de fermentación: Etapa en donde se adicionó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el Sulfato de Amonio permitiendo que el proceso de fermentación tenga una fuente nutritiva hasta llegar a su fase estacionaria; seguidamente se llevó al biorreactor y se controló la temperatura, agitación y el pH.
- 3) Separación y recogida del producto: Al terminar el proceso de fermentación se obtuvo una pasta rica en proteínas, la cual se separó del efluente por medio de una centrifugación, posteriormente se secó y se llevó a almacenamiento, a temperatura ambiente de 25°C.

Para el desarrollo de la fase experimental se utilizó el diseño  $2^K$ , en donde  $K$  es el número de factores con dos niveles, los factores para este diseño fueron: cantidad de Sulfato de Amonio, temperatura y agitación, las características del experimento fueron: ocho tratamientos, a los cuales se les realizó tres repeticiones teniendo así 24 unidades experimentales, formadas por 2000 ml de lactosuero cada una, se obtuvieron 8 productos finales (mejores repeticiones), que fueron sometidos a pruebas físico-químicas: humedad, ceniza y porcentaje de proteína.

Terminado los análisis estadísticos del diseño experimental  $2^K$ , se determinó que el punto óptimo para producir proteína unicelular a partir de lactosuero, fue el tratamiento (ab), con un rendimiento en base seca de 28,2 g y con un 42,23% de proteína. Los factores que tuvo este tratamiento fueron: Sulfato de Amonio: 150 ml, temperatura: 30°C y 200 rpm, en un tiempo de fermentación de 18 horas.

## SUMMARY

The present investigation had as objective the optimization of parameters for the production of single cell protein from lactosuero; achieving the main by product of the milky industry so has an appropriate use, avoiding the environmental pollution in those areas where it is poured, to not grant him in a future very distant an added value for the animal consumption and a nutritional source for the human consumption.

The investigation consisted on three stages:

This study consisted almost three stages:

- 1) Pre treatment lactosuero: Where deproteinized the feedstock and adding trichloro acetic acid, and was carried pasteurization.
- 2) Fermentation process: Stage in which was added the yeast *Saccharomyces cereviciae* and ammonium sulfate allowing the fermentation process has a nutritional source to reach the stationary phase; then it was carried the bioreactor and was monitored the temperature, agitation and the pH.
- 3) Separation and collection of the product: The end of the fermentation process a paste rich in proteins was obtained, which was separated from the effluent by centrifugation, then dried and taken to storage at room temperature of 25 ° C.

For the development of the experimental design phase  $2^k$ , where  $k$  is the number of factors with two levels, the factors used for this design were: ammonium sulfate, temperature and agitation, the features of the experiment were eight treatments , to which was performed in three replicates and having 24 experimental units, consist of 2000 ml of lactosuero each one, and eight end products (best repeats), were subjected to physico-chemical evidence was obtained for moisture, ash and percentage protein.

Statistical analysis completed  $2^k$  experimental design, it was determined that the optimum for producing single cell protein whey starting point was the treatment (ab), with a performance of 28,2 g dry basis and 42,23% protein. The factors that had diagnosis were: Ammonium Sulfate: 150 ml, temperature: 30 °C and 200 rpm in a fermentation time of 18 hours.

# GENERALIDADES

## 1.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción de leche está esencialmente destinada a la elaboración de queso fresco, siendo el lactosuero el principal subproducto obtenido, que hasta ahora no tiene un adecuado tratamiento, sabiendo que contiene un 20% de proteína presente en la leche, además de carbohidratos y minerales. Según investigaciones realizadas en el año 2013 por Garrido y Tuninetti, en el Ecuador se genera 450 mil toneladas de lacto suero al año, sin embargo la mayoría de las empresas lácteas no están dedicadas al procesamiento del lactosuero, simplemente se elimina de forma directa en las tuberías contaminando el ambiente o bien es comercializado a bajos costos para alimentación animal, a pesar de las bondades nutritivas que este contiene, principalmente el porcentaje de proteína, con el cual se podría obtener una biomasa unicelular rica en proteínas.

El crecimiento de la población, especialmente en las naciones en vías de desarrollo es abrumador. La agricultura y ganadería convencional muy posiblemente no sean capaces de suplir la demanda proteica de la población, proyectándose que el planeta necesitará producir una gran cantidad de productos agrícolas igual a los generados a través de la historia antes de esta fecha.

La biomasa puede ofrecer una gran alternativa para reemplazar algunas de las fuentes tradicionales de proteína, por ello el desarrollo e implementación de técnicas de producción industrial de proteína unicelular ayudarían a solventar el problema de la cada vez más limitada disponibilidad e ingesta de proteína.

En el Ecuador aún no se ha profundizado investigaciones sobre la proteína unicelular, ya sea por la falta de conocimiento o falta de tecnologías, sin embargo el interés de producir proteína unicelular está incrementando, ya que por tener un alto valor nutricional, podría incluirse en la dieta diaria de consumo humano, permitiendo así la sustitución parcial de algunas de las fuentes tradicionales de alimentación con alto nivel proteico como es el caso de la carne, los cereales, soya, leche, huevos.

## 1.2 PROBLEMA

El principal subproducto de las industrias lácteas es el lactosuero, el cual no es aprovechado en su totalidad debido a la falta de equipos tecnológicos, que permitan la transformación e innovación de productos alimenticios para el consumo humano o animal, por lo tanto al no ser tratados específicamente se los desecha y por ende van a parar a los canales de riego o a los basurales, originando graves problemas de contaminación en aquellas zonas donde es vertido.

Según Yáñez & Montalvo (2013) por cada 100 litros de lactosuero desechado se genera cerca de 35 Kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 Kg de demanda química de oxígeno (DQO), lo que representa a una fuerza contaminante equivalente a la de las aguas negras producidas por 450 personas por día.

Según Chiancone (1992) por cada kilogramo de queso producido se generan 9 kilogramos de suero y anualmente a nivel mundial se producen 110 millones de toneladas.

Sin embargo tanto las grandes como las pequeñas industrias lácteas no perciben o no tienen conciencia del daño ambiental que el lactosuero causa cuando es desechado sin ningún control previo, ocasionando que nuestro medio de destruya cada vez más y más.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad los subproductos agroindustriales son las materias primas más diversas a nivel mundial, como es el caso del lactosuero, subproducto de la industria láctea, que se puede encontrar fácilmente en los centros de procesamiento de leche y su costo es sumamente económico, lo cual hace que sea una materia prima adecuada para el procesamiento e innovación de productos agroindustriales, como es el caso de la proteína unicelular.

Mediante el procesamiento del lactosuero, el cual es un subproducto de elevada utilidad industrial puede convertirse en una fuente económica de ingresos extras para las industrias lácteas, gracias a que puede generarse alternativas para obtener productos no tecnificados, como las bebidas fermentadas, bebidas para los diferentes tipos de ganado, y la misma proteína unicelular.

La proteína unicelular al tener un alto valor nutricional por sus propiedades funcionales específicas, podría incluirse en la dieta diaria de consumo, permitiendo así la sustitución parcial de algunas de las fuentes tradicionales de alimentación con alto nivel proteico como es el caso de la carne, los cereales, soya, leche, huevos.

Las características que se han mencionado acerca de la proteína unicelular conducen a la concientización de consumir la misma, a fin de proponer una alternativa nueva y diferente contribuyendo con el mejoramiento de la calidad de vida en las personas.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 OBJETIVO GENERAL**

- Optimizar los parámetros para la producción de proteína unicelular a partir de lactosuero.

### **1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir curvas de fermentación, en función de temperatura y tiempo.
- Probar parámetros óptimos de fermentación (temperatura y agitación).
- Analizar la calidad nutricional del producto final mediante pruebas físico-químicas (proteína, ceniza, humedad).
- Evaluar el rendimiento de la biomasa, mediante el balance de materiales.

## **1.5 HIPÓTESIS**

**Hi:** La fuente de nitrógeno, la temperatura, la agitación, influyen en el rendimiento y la calidad nutricional de la proteína unicelular, obtenida a partir del lactosuero desproteínizado.

**Ho:** La fuente de nitrógeno, la temperatura, la agitación, no influyen en el rendimiento y la calidad nutricional de la proteína unicelular, obtenida a partir del lactosuero desproteínizado.

# MARCO TEÓRICO

## 2.1 LACTOSUERO

Según Fontecha, Recio, & Pilosof, (2009), el lactosuero es definido como “la sustancia líquida obtenida por la separación del coágulo de la leche en la elaboración de queso”.

Es un líquido translucido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína.

Durante la elaboración del queso, se hace coagular la leche mediante la adición de cuajo. Con este proceso, la leche se descompone en dos partes: una masa semisólida, compuesta de caseína; y un líquido, conocido como suero de leche, que es un líquido transparente con una peculiar tonalidad amarillo-verdosa y un sabor ligeramente ácido, aunque agradable.

Contiene hidratos de carbono en forma de lactosa o azúcar de leche y por ello se utiliza en un gran número de procesos fermentativos para la producción de etanol, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido cítrico, glicerol, proteína unicelular, enzimas (galactosidasa o lactasa), grasas y aceites, butanol y acetona, polisacáridos extracelulares y vitaminas, entre otros.

El suero representa del 80 al 90% del volumen que entra en el proceso y contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche original; proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales. Aunque el suero contiene nutrientes valiosos, solo recientemente se han desarrollado nuevos procesos comerciales para la fabricación de productos de alta calidad a partir de dicho suero.

El suero es la fracción líquida de la leche que se genera como un subproducto o residual de la fabricación del queso y además se produce en grandes volúmenes, alrededor de 9L por kg de queso producido. El azúcar principal en el suero es la lactosa, que se encuentra en concentraciones entre 3 y 8% (Tribaldo & Josep, 1988).

Garrido & Tunineti (2013) afirman que en el Ecuador el 34% de la producción de leche se destina exclusivamente a la producción de quesos, actividad realizada por el 70% de las empresas lácteas y más del 90% de las Pymes lácteas, siendo el lactosuero el principal subproducto, se estima unas 450 mil toneladas anuales de suero líquido de las cuales, el 33%

se destina a la obtención de lactosa y derivados proteicos y el 5% es transformado en suero en polvo. El 60% restante se desecha como efluente o es utilizado para la alimentación animal

## 2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL LACTOSUERO

Sus características corresponden a un líquido turbio de color verdoso amarillento, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido.

### 2.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición del suero varía considerablemente dependiendo del origen de la leche y el proceso de manufactura que lo envuelve, de ello dependerá su uso. Pero en general, el suero está compuesto principalmente por agua (cerca del 93%), lactosa (4,9 a 5,1%), proteína soluble (0,9 a 1 %), minerales (0,5 a 0,7%), lípidos (0,1 a 0,3%) y ácido láctico (0 a 0,2%).

**Tabla 1.** Composición Química

<b>COMPONENTES</b>	<b>PORCENTAJE</b>
Grasa	0,3
Proteína	0,55
NNP (nitrógeno no proteico)	0,18
Lactosa	4,8
<b>Total</b>	<b>5,8</b>
<b>Sales minerales</b>	<b>0,6</b>
Calcio	0,04
Fósforo	0,04
Sodio	0,05
Potasio	0,16
Cloruro	0,11
Ácido Láctico	0,2
<b>Sólidos totales</b>	<b>6,4</b>
<b>Agua</b>	<b>93,6</b>

**Fuente.** (Huerta, 2006)

## 2.3 TIPOS DE LACTOSUERO

Puede ser suero dulce o suero ácido.

### 2.3.1 LACTOSUERO DULCE

Según Miranda, Ponce, Fonseca, Cutiño, Díaz, & Cedeño. (2009), el suero, como subproducto de la elaboración de quesos blandos, duros o semiduros y de la producción de caseína de cuajo, es conocido como suero dulce y tiene un pH de 5,9-6,6.

Proviene de quesos coagulados con renina, la mayoría de este suero se compone de nitrógeno no proteico (22% del total) y tiene una gran concentración de lactosa (cerca del 51% de todo el suero); es el más rico en proteínas (7%) pero muy pobre en cuestión de ácido láctico (0%). El resto del suero es un conjunto de sales, minerales y grasas que varían de especie a especie.

### 2.3.2 LACTOSUERO ÁCIDO

Según Miranda et al. (2009), la fabricación de caseína precipitada por ácidos minerales da lugar a un suero ácido con un pH de 4,3-4,6.

Proviene de quesos coagulados con ácido acético. Es el subproducto común de la fabricación de queso blanco y por su pH (4,6) resulta corrosivo para los metales.

Contiene una mayor proporción de nitrógeno no proteico (27% del total) y posee menos lactosa en concentración de (42%) ya que, por provenir de leches ácidas, parte de la lactosa se convierte en ácido láctico (10%) y debido a la desnaturalización es más pobre en proteínas (6,0).

**Tabla 2.**Tipos de suero

<b>Componente</b>	<b>Lactosuero dulce (g/l)</b>	<b>Lactosuero ácido (g/l)</b>
Sólidos totales	63,0-70,0	63,0-70,0
Lactosa	46,0-52,0	44,0-46,0
Proteína	6,0-10,0	6,0-8,0
Calcio	0,04-0,6	1,2-1,6
Fosfatos	1,0-3,0	2,0-4,5
Lactato	2	6,4
Cloruros	1,1	1,1

**Fuente.** Miranda et al (2009)

## 2.4 FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO

Se obtiene cuando se corta la leche, se separa el cuajo del suero y este último se fermenta, obteniéndose un líquido de sabor parecido al vinagre, rico en bacterias gram + anaerobias y ácido láctico.

Quintero, Harvey; Rodríguez, Mawill; Páez, Gisela; Ferrer, José; Mármol, Zulay; Rincón, Marisela (2001), señalan que el bioprocesamiento del suero de leche para obtener proteína unicelular, puede llevarse a cabo tanto en cultivo por carga, como en cultivo continuo. En este último caso se obtiene una mayor productividad de biomasa, dado que se disminuye el tiempo de duración de todo el proceso. Por otra parte mediante el cultivo continuo es posible calcular los parámetros de crecimiento de los microorganismos empleados.

Las condiciones ambientales y el patrón de crecimiento, determinan la calidad del producto y la máxima eficiencia de conversión obtenible, la productividad y la concentración del producto. Sin embargo los procesos de producción industrial debe también ser diseñados de tal forma que la velocidad global, la eficiencia y la concentración del producto están restringidas en último término por la capacidad de transferencia de masa y de calor del fermentador, de forma que se haga el uso máximo de la energía disponible (Bu lock & Kristiansen, 1991).

La actividad enzimática a través de la fermentación deberá ser evaluada a fin de definir el punto en el que el microorganismo produzca el rendimiento más alto recuperable de la enzima deseada. Algunas de las enzimas son producidas en las etapas tempranas, medias o tardías del crecimiento bacteriano. Además la producción de materiales adversos, que interfieran con las enzimas, o de contaminantes, será puesta en consideración antes de terminar la fermentación y cosechar las células.

Las células microbianas son recogidas generalmente por centrifugación para concentrarlas y liberarlas de los metabolitos constituyentes del medio. A veces, las células se lavan, generalmente suspendiéndolas en un tampón adecuado y se centrifugan de nuevo para concentrarlas. Las células concentradas o empaquetadas pueden ser congeladas o utilizadas inmediatamente para la purificación de la enzima (Brewer, 2007).

## 2.5 LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son grandes moléculas que están formadas por la unión de varios aminoácidos. Estas proteínas cumplen una función esencial en nuestro organismo, ya que están involucradas en todos los procesos biológicos que ocurren en el cuerpo.

Las proteínas presentan una estructura muy compleja y por ese motivo puede mostrar un comportamiento extraordinariamente dispar. Sin duda, este aspecto tiene que ver con las altas masas moleculares, a lo que hay que añadir que las proteínas no se componen a partir de una única sustancia original, estas están formadas a partir de 20 aminoácidos distintos (Baltes, 2007).

## 2.6 PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

Las proteínas del lactosuero, que representan alrededor del 20% de las proteínas de la leche de vaca, se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a pH 4,6; a una temperatura de 20°C.

La composición proteica del lactosuero presenta diferencias notables dependiendo de la especie considerada. Mientras no se diga otra cosa, se hará referencia a la especie bovina.

**Tabla 3.** Proteínas del lacto suero

	<b>Gramos/Litro</b>	<b>% Proteína Total</b>
<b>Caseínas (totales)</b>	27	80
$\alpha$ Caseína	10-16	31-45
$\beta$ Caseína	8-12	24-34
$\kappa$ Caseína	10-15	3-5
$\gamma$ Caseína	4-6	1,0-1,5
<b>Proteínas del suero</b>	6	20
Lacto albumina	1,0-1,5	3,3-5,0
Lacto globulina	2-4	6,6-13,3
Inmunoglobulinas	0,7-0,8	2,3-2,7
Otras	1-2	3,7

**Fuente.** (González, 2010)

### **2.6.1 CONCENTRADOS DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE (CPSL)**

Los concentrados de proteína del lactosuero son elaborados por la ultrafiltración, que consiste de una membrana semipermeable, la cual selectivamente permite pasar materiales de bajo peso molecular como agua, iones y lactosa, mientras retiene materiales de alto peso molecular como la proteína. El retenido es así concentrado por evaporación y liofilizado.

### **2.6.2 PROTEÍNAS DE SUERO DE LECHE AISLADAS Y PURIFICADAS**

Diversas proteínas de suero de leche aislada, fraccionada o purificada, como la beta-lacto globulina, la alfa-lacto albúmina y el glicomacropéptido, entre otros, ya están comercialmente disponibles en el mercado. Estos ingredientes proteicos aislados tienen atributos nutricionales únicos y superiores, así como propiedades funcionales muy interesantes. Estas características nutricionales y funcionales no están presentes en CPSL tradicionales, dado que la bioactividad, propiedades nutricionales y funcionalidad de estas proteínas requieren de una alta pureza, por ejemplo, pureza mayor al 90%, para ser lo suficientemente potente para tener los efectos deseados sobre los seres humanos (Zhadow, 2003).

### **2.6.3 IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS DE LACTOSUERO**

No constituyen la fracción más abundante, pero es la más interesante en los terrenos económico y nutricional. Representa una rica y variada mezcla de proteínas secretadas que poseen amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales. Concretamente, suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche de bovino, siendo su principal componente la  $\beta$ -lacto globulina ( $\beta$ -LG) con cerca de 10% y  $\alpha$ -lacto albúmina con 4% de toda la proteína láctea, además, contiene otras proteínas como, lacto ferrina, lacto peroxidasa, inmunoglobulinas, y glicomacropéptidos. La  $\beta$ -LG es secretada en leches de rumiantes con alta resistencia a la digestión gástrica, lo que origina intolerancia y/o alergenidad en seres humanos, sin embargo, tratamientos industriales como la esterilización, calentamiento o presión hidrostática alta y la hidrólisis mejoran la digestibilidad de la  $\beta$ -LG presente en el lactosuero.

Las proteínas de este subproducto de la industria quesera desempeñan un importante papel nutritivo como una rica y balanceada fuente de aminoácidos esenciales 26%, además, son de alto valor biológico (por su contenido en leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados),

tienen una calidad igual a las del huevo y no son deficientes en ningún aminoácido, esto puede ser observado en la Tabla 4, donde se relaciona el contenido de aminoácidos que contiene el lactosuero respecto al huevo, encontrándose que la leucina y lisina son los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad, además, parecen ejercer determinados efectos biológicos y fisiológicos, potenciando la respuesta inmune, tanto humoral como celular (Parra, 2009).

#### **2.6.4 BENEFICIOS FUNCIONALES Y SENSORIALES**

Desde un punto de vista sensorial, las proteínas de suero típicamente tienen un sabor neutro poco perceptible, lo cual las hace fáciles de incorporar a otros sistemas de bebidas o alimentos, sin tener que enmascarar otros sabores.

La proteína de suero de leche es una proteína completa de alta calidad que contiene todos los aminoácidos esenciales que el cuerpo necesita. Además de proveer proteína para la dieta, su consumo tiene otros atributos asociados a la salud. Han demostrado tener efectos positivos en segmentos diferentes, como la nutrición deportiva, el sistema inmunológico, el tratamiento de cáncer, la salud cardiovascular, la inducción del sueño y la nutrición infantil (Cribb, 2004).

Los centros de investigación alrededor del mundo desarrollan con frecuencia avances en la prevención del cáncer y nuevas terapias para combatirlo. Se ha demostrado que las proteínas de suero de leche reducen la cantidad y tamaño de varios tumores cancerígenos, en estudios realizados tanto en animales como humanos.

En el Arkansas Children's Nutrition Center, "Se demostró que ratas alimentadas con una dieta en base a proteínas de suero de leche desarrollaron menos y más pequeños tumores de pecho que aquellas ratas utilizadas en el control" (Bradger, 2011).

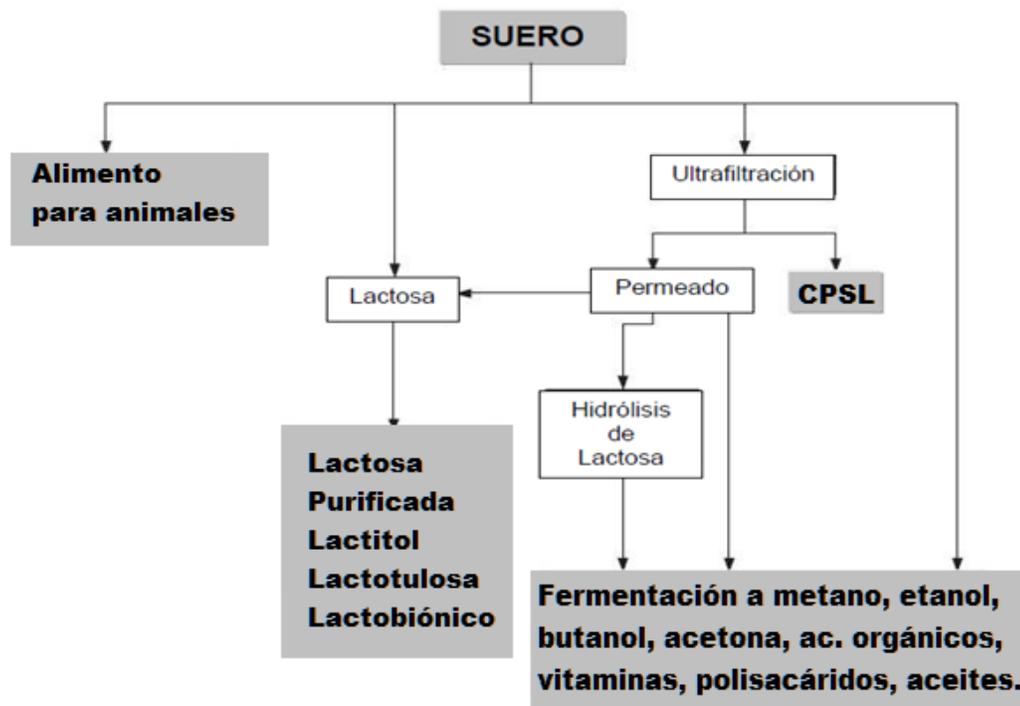
El suero de leche además posee un alto valor nutritivo, es rico en sales minerales, vitaminas y aporta todos los aminoácidos necesarios para el organismo, además de aminoácidos ramificados, lo que favorece la síntesis proteica, la ganancia de masa muscular y evita el catabolismo de los tejidos (pérdida de tejido muscular).

### 2.6.5 APLICACIONES

Las proteínas de suero de leche han sido incorporadas a productos alimenticios que incluyen barras nutricionales, bebidas en polvo y listas para beber, productos de panificación, lácteos, de confitería, postres congelados, etc. El sabor neutro típico de las proteínas de suero de leche es un beneficio adicional a la hora de formular productos fortificados, ya que no tendrá interferencia con el sistema de sabor en general.

Las proteínas de suero de leche son una de las fuentes naturales más completas de proteína y aminoácidos esenciales que se pueden encontrar para fortificar alimentos y bebidas. Pueden ser incorporadas a casi cualquier sistema, para aprovechar su contenido proteico, su contenido de aminoácidos esenciales, sus beneficios nutricionales únicos y específicos y su funcionalidad física. El resultado será el desarrollo de nuevos sistemas de alimentos, que tomen ventaja de los crecientes beneficios para la salud asociados a las proteínas de suero de leche (Cribb, 2004).

Figura 1 Usos del lacto suero



Fuente. (Huerta, 2006)

## 2.6.6 AMINOÁCIDOS PRESENTES EN EL SUERO DE LA LECHE

La aportación del suero de leche es muy alta, igualmente, en los tres aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), leucina, isoleucina y valina que son esenciales para el crecimiento y la reparación muscular, y el proceso de la síntesis de proteínas.

**Tabla 4.** Aminoácidos presentes en el Lactosuero y Huevo en g/100g.

AMINOÁCIDO	LACTOSUERO	HUEVO	EQUILIBRIO RECOMENDADO POR LA FAO
Treonina	6,2	4,9	3,5
Cisteína	1	2,8	2,6
Metionina	2	3,4	2,6
Valina	6	6,4	4,8
Leucina	9,5	8,5	7
Isoleucina	5,9	5,2	4,02
Fenilalanina	3,5	5,2	7,3
Lisina	9	6,4	5,1
Histidina	1,8	2,6	1,7
Triptófano	1,5	1,5	1,1

**Fuente.** Miranda et al. (2009)

Los aminoácidos y las proteínas que conforman, tienen propiedades estructurales de primera importancia. Forman el armazón del cuerpo, (constituyen todo el tejido conjuntivo, o conectivo), incluidos los músculos, los huesos, las articulaciones, los tendones, la piel, el cabello, las arterias, las venas, las uñas y todos los órganos, así como las glándulas endocrinas y el sistema nervioso central.

Por lo tanto, las proteínas son los bloques fundamentales necesarios para reparar a nuestras células, tejidos y órganos del desgaste diario, evitando su deterioro y su degradación, y también para lograr que el cuerpo funcione de manera eficiente y óptima todos los días. Para que nuestro nivel de energía y de vitalidad sea satisfactorio, tener una buena calidad de vida, y desempeñar con eficiencia actividades productivas (Bradger, 2011).

## 2.7 PROTEÍNA UNICELULAR

Se puede decir que se denomina bioproteína o proteína unicelular, a aquella que se obtiene de la biomasa microbiana de bacterias, levaduras, algas y hongos filamentosos. La proteína unicelular deriva de la retracción de "proteínas de organismos unicelulares", el cual es el término más adecuado. La literatura científica usa el término SCP (single cell protein), para referirse a la proteína unicelular.

La biomasa es producida por organismos vivos, principalmente a través de la actividad fotosintética de las plantas, pero también es producida por los animales, los insectos, los microorganismos. Está compuesta principalmente de polímeros complejos de carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno (Bu'lock & Kristiansen, 1991).

A partir de la biomasa microbiana pueden desarrollarse muchos productos derivados dada su riqueza composicional: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. Los primeros microorganismos empleados como fuente de proteína fueron las levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, que aún hoy día es la principal fuente de SCP con una producción de 200.000 toneladas anuales en peso seco, así como también la Spirulina, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*, la obtención de proteína unicelular no solo dependerá del tipo de microorganismo a usar sino también del sustrato, el proceso y la misma calidad deseada de la biomasa (Demien, 2010).

### 2.7.1 PORQUE PROTEÍNA UNICELULAR

El crecimiento de la población, especialmente en las naciones en vías de desarrollo es abrumador esperándose en la primera década del siglo XXI que la población mundial alcance entre cinco y seis billones de personas. La agricultura y ganadería convencional muy posiblemente no sean capaces de suplir la demanda proteica de esta emergente población, proyectándose que el planeta necesitará producir entre los años 1980 y 2015 una cantidad de productos agrícolas igual a los generados a través de la historia antes de esta fecha (Chacón, 2004).

El interés de producir SCP fue estimulado por muchas publicaciones de las agencias internacionales relacionadas con la salud, la alimentación y la agricultura acerca de la escasez

de proteína a nivel mundial. En los países desarrollados los altos niveles de vida han originado una creciente demanda de proteínas de alta calidad.

Cuando se compara con los métodos tradicionales para producir proteínas para alimento o piensos, la producción industrial a gran escala de biomasa microbiana para el mismo uso tiene algunas ventajas características: los microorganismos en general tienen una alta velocidad de multiplicación, un alto contenido en proteína, (en términos de peso seco la biomasa microbiana puede contener 30-80% de proteína), pueden utilizar un gran número de fuentes de carbono diferentes, (algunas de las cuales son consideradas tradicionalmente como desechos), pueden seleccionarse o producirse relativamente fácilmente cepas con alta producción y buena composición (Bu'lock & Kristiansen, 1991).

### **2.7.2 PERSPECTIVAS ACTUALES DE LA PROTEÍNA UNICELULAR**

La producción de proteína unicelular ha representado desde principios del siglo XX una opción biotecnológica de discutida viabilidad en el manejo y aprovechamiento de grandes cantidades de desechos orgánicos de origen agrícola, constituyendo una alternativa recurrente para convertir estas fuentes de polución en materiales útiles desde un punto de vista económico, nutricional e industrial.

La biomasa puede ofrecer una gran alternativa para reemplazar algunas de las fuentes tradicionales de proteína, por ello el desarrollo e implementación de técnicas de producción industrial de SCP ayudarían a solventar el problema de la cada vez más limitada disponibilidad e ingesta de proteína (Chacón, 2004).

La proteína unicelular puede obtenerse a partir de un bioproceso continuo, en el que se cultivan células en un sistema abierto hasta alcanzar el estado estacionario, lográndose una mayor productividad que en el bioproceso por carga. Estudios realizados en cultivos por carga con diferentes concentraciones de lactosa, indican que se obtiene una mayor producción microbiana a bajas concentraciones de este azúcar Butriago et al. (2008).

## 2.8 AMINOÁCIDOS PRESENTES EN LA PROTEÍNA UNICELULAR

El perfil de aminoácidos esenciales es uno de los factores básicos a la hora de evaluar la calidad de un sustrato proteico como alimento. Por lo general los aminoácidos limitantes son la lisina, metionina y el triptófano. El perfil de aminoácidos de levadura es favorable, con niveles satisfactorios de la mayoría de los aminoácidos esenciales, manteniéndose eso si las bajas proporciones de aminoácidos sulfurados como factor limitante y alcanzándose de hecho niveles críticos en la metionina.

**Tabla 5.** Perfil de aminoácidos en g/100g de proteína.

Aminoácido	Hongos filamentosos	Algas	Levaduras	Bacterias	FAO
Lisina	3,9	4,6	7,7	7,6	4,2
Treonina		4,6	4,8	5,4	2,8
Methionina	1	1,4	1,7	2	2,2
Cisteina		0,4			
Triptofano	1,25	6	1		
Isoleusina	3,2	8	4,6	5,3	4,2
Leusina	5,5	6,5	7	7,3	4,8
Valina	3,9	5	5,3	7,1	4,2
Fenilalanina	2,8		4,1	4,6	2,8
Histidina			2,7	7,8	
Arginina			2,4	6,4	

Fuente. (Chacón, 2004)

### 2.8.1 USOS DE LA BIOMASA Y PROTEÍNA UNICELULAR

El uso de la proteína unicelular en piensos es el más inmediato y menos tecnificado de todos. Generalmente implica un secado de la biomasa previamente a la ingesta. En el caso de consumo por parte de humanos el proceso es más elaborado, implicando no solo la remoción de riesgos nutricionales como los ácidos nucleicos, sino también el de garantizar la calidad y seguridad del producto (Duran, 1986).

## 2.9 LEVADURAS Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO

Para la producción de proteína unicelular se tomara en cuenta tres tipos de levaduras las cuales se describen a continuación.

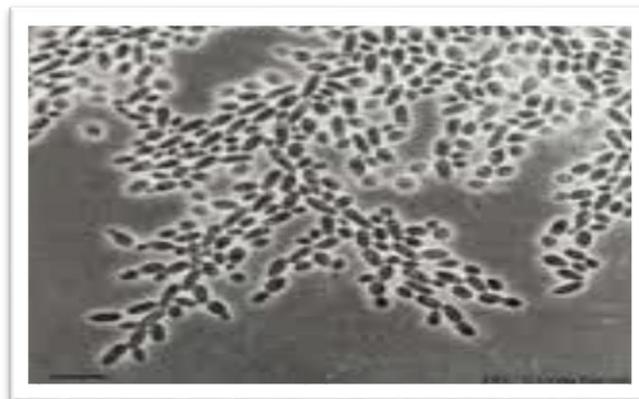
- *Candida kefir o Utilis*: Producto liofilizado, lactosa positiva. Mantenido en medio Saborou glucosado (Difco, Becton, Dickinson and Company) a temperatura ambiente.



**Figura 2.** *Candida kefir o Utilis*

**Fuente.** (Zumbado, Esquivel, & Wong, 2006)

- *Kluyveromyces marxianus sp*: Producto liofilizado. Almacenado a una temperatura de -40 °C. Levadura lactosa positivo.



**Figura 3.** *Kluyveromyces marxianus sp.*

**Fuente.** Zumbado et al. 2006

- *Saccharomyces cerevisiae*: Levadura seca instantánea. Almacenado a temperatura ambiente de 25°C. Levadura lactosa positivo.



**Figura 4.** *Saccharomyces cerevisiae*

**Fuente.** Zumbado et al. 2006

El suero de leche contiene componentes de alto valor nutritivo, pero en concentraciones muy pequeñas y en forma no siempre asimilable para los seres humanos. El contenido de lactosa en el suero es de 4,5% aproximadamente y contiene además el 20% de las proteínas totales de la leche entera.

El procesamiento biotecnológico del suero de la leche genera un producto de interés para el sector agroindustrial, tales como bebidas fermentadas, ácidos orgánicos, (ácido láctico y propiónico) y proteína microbiana. Para la obtención de estos productos se utilizan microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, y *Kluyveromyces*), que son capaces de consumir los nutrientes del suero, principalmente la lactosa, disminuyendo así su potencial contaminante, al mismo tiempo que se obtienen productos útiles Quintero et al. (2001).

### **2.9.1 *Saccharomyces cerevisiae***

Conocida desde la antigüedad, la levadura del pan, del vino y de la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, se ha convertido en un organismo de estudio común en el laboratorio. La investigación biotecnológica ha mantenido el uso tradicional que se ha hecho de esta levadura, mejorando e innovando los procesos de panificación y de producción de bebidas alcohólicas.

A la vez, este organismo ha ganado protagonismo en el laboratorio al convertirse en un potente modelo biológico de organismos eucariotas.

La secuenciación completa del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* -concretamente, de la cepa de laboratorio S288C- se finalizó en 1996, tras cuatro años de un proyecto liderado por la Unión Europea y la participación de más de cien laboratorios de todo el mundo. Fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado y actualmente es el genoma eucariota mejor conocido.

La maquinaria molecular de muchos procesos celulares se encuentra conservada tanto en levaduras como en plantas y en mamíferos. Esto se ilustra con el hecho de que rutinariamente se han introducido genes de eucariotas superiores en levaduras para el análisis sistemático de su función.

Por estas razones, *S. cerevisiae* se ha convertido en una importante herramienta a gran escala de análisis funcional, proporcionando un punto de partida para el análisis de organismos eucariotas más complejos. Al ser un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, la levadura se puede utilizar para los estudios de células que resultarían muy complicados o costosos en organismos multicelulares.

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente este proceso se lleva a cabo cuando esta levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares (como la D-glucosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación.

Desde el punto de vista científico, este microorganismo se ha empleado como modelo simple de la célula eucariota. Esto se debe a una serie de ventajas como su facilidad de cultivo y su velocidad de división celular (aproximadamente dos horas).

### **2.9.2 *Candida utilis***

Se utiliza principalmente en la producción de proteína unicelular, debido a su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono, como la paja de arroz almidón de papa en aguas residuales, aceite de aguas residuales y melaza. Ensayos con *Candida utilis* sobre extractos

ácidos de paja de arroz, produjeron 3,5 g/ L de biomasa en base seca. También se ha usado como soporte para producir varios productos químicos, tales como el glutatión, monelina y el acetato de etilo (Carrillo, Aguilar, Wong, & Muñiz, 2010).

Dependiendo de su origen, las levaduras son ricas en proteína y vitaminas, además poseen la propiedad de no ser tóxicas, presentan alta digestibilidad, elevado contenido en proteínas, grasas, carbohidratos y buen sabor.

Los valores promedios de proteínas, expresados en porcentajes de materia seca, para *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Saccharomyces Cerevisiae* y *Kluyveromyces Marxianus* varía entre 33 y 45 %, con un 7 al 9 % de lisina y un bajo porcentaje de aminoácidos azufrados (de 0,7 a 1,7 % de cisteína y de 1 a 2 % de metionina).

*Candida utilis*, es una levadura que tiene una alta tasa de crecimiento, que ninguna especie ha logrado superar, y que requiere de un sustrato rico en azúcares o fuentes de carbono, para su crecimiento o cultivo debido a su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono rápidamente; es rica en proteína y vitaminas del complejo B, apropiada para la alimentación animal y humana (Palmerín, Guevara, Villaseñor, & Pérez, 2011).

### **2.9.3 *Kluyveromyces marxianus***

*Kluyveromyces Marxianus*, primero fue descrita en 1888 por E. C. Hansen, que en aquel momento fue nombrado *Saccharomyces Marxianus*, después de Marx, la persona que originalmente había aislado esta levadura procedente de las uvas (Lodder y Kreger-van Rij 1952). En su monografía, (Lodder y Kreger-van Rij 1952), describen diez cepas de *S. Marxianus*, entre las cuales una cepa particular fue etiquetada como *Zygosaccharomyces Marxianus*, que había sido depositada en el Central Bureau Boor Schimmel cultures (CBS) en 1922 por H. Schnegg, arbitrariamente fue elegida como la cepa tipo. Esto corresponde a la actual cepa CBS 712. Algunas diferencias entre las diez cepas mencionadas fueron ya señaladas en aquel momento, en cuanto a la formación de *pseudomycelium* y la capacidad de asimilar y fermentar la lactosa. (Graciano, Heinzle, Wittmann, & Gombert, 2008).

Sinónimos: (*Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces marxianus*), es cultivada inicialmente en un fermentador discontinuo a 30°C y pH 4,5 en el medio que tiene la siguiente composición: urea o sulfato amónico 0,083 mol/l; fosfato di ácido de potasio

0,020mol/l; cloruro de calcio, 1,8 mmol/l; cloruro de sodio, 3,4 mmol/l; sulfato de magnesio, 3,3 mmol/l; cloruro férrico, 3,6  $\mu$ mol/l; sulfato de zinc, 3,3 $\mu$ mol/l; sulfato de cobre, 0,7  $\mu$ mol/l; sulfato de manganesio,0,4  $\mu$ mol/l; molibdato sódico, 0,05  $\mu$ mol/l; ácido nicotínico, 45,5  $\mu$ mol/l; pantotenato de calcio, 2,8  $\mu$ mol/l; biotina, 0,16  $\mu$ mol/l, ;hasta alcanzar una concentración de biomasa superior a 10gl-1. Este cultivo es utilizado como inóculo del fermentador principal (Castrillo, Zaldivar, Alvarez, Villamil, & Bada, 1992).

#### **2.9.4 SELECCIÓN DE UN MICROORGANISMO**

A utilizarse en la producción de proteína unicelular, se toman en cuenta aspectos de índole económico y práctico, que podrían dar ventajas a utilizar un microorganismo u otro.

En un proceso por lotes o batch, el ciclo de crecimiento debe ser tan corto como sea posible, para obtener el mayor rendimiento y utilización del equipo, esto implica una reducción de los costos de operación, que incluyen la energía, gastos generales, costos de mano de obra y la capacidad del sistema. Las levaduras *K. Marxianus* y *C. kefir* presentan esta ventaja respecto a *S. Cerevisiae* al presentar un menor tiempo de fermentación.

Las levaduras *K. Marxianus* y *S. Cerevisiae*, son consideradas como organismos GRAS (Generalmente reconocida como segura) según la FDA.

La cepa de *C. kefir* no se ha encontrado que sea patógena, sin embargo no ha sido aceptada como segura para ser utilizada en la alimentación animal o humana, por lo que sería necesario realizar un proceso de investigación previo a la utilización de su biomasa a nivel industrial.

Al utilizar la levadura *S. Cerevisiae*, implica un tiempo de fermentación más prolongado y una menor productividad. La hidrólisis enzimática de la lactosa del suero requiere la utilización de enzima libre, lo cual implica mayores costos económicos, tanto por la compra de los preparados enzimáticos, como por el tiempo y funcionamiento de equipos durante la hidrólisis.

La especie *K. Marxianus* presenta mayores ventajas para ser utilizada en la producción de proteína unicelular en suero de leche, que las levaduras *C. kefir* y *S. Cerevisiae*. El comparar las tres levaduras bajo las mismas condiciones ambientales y sin la suplementación del suero, permite determinar cómo *K. Marxianus* se desarrolla de forma más eficiente en el medio.

En caso de utilizarse esta levadura para el tratamiento del suero de queso en un sistema por lotes, presentaría un tiempo de fermentación menor, que resultaría en una ventaja económica y práctica, y una mayor productividad, que aseguraría una mayor velocidad en la generación del producto de interés Zumbado et al. (2006).

La bioseguridad, la disponibilidad técnica y la estabilidad biológica son aspectos a tener en cuenta para la selección de determinada cepa como fuente de proteína unicelular, otros aspectos importantes para la selección del microorganismo son su estabilidad genética, la capacidad de crecer en un proceso continuo, la especificidad al substrato que se le ofrece, su demanda de nutrientes, la facilidad con que la biomasa obtenida puede separarse del medio de cultivo, y la calidad final deseada en el producto.

## **2.10 BIORREACTORES PARA LA FERMENTACIÓN**

Cualquier proceso biotecnológico de nivel industrial tuvo que haber pasado por las siguientes operaciones: laboratorio, planta piloto o industrial, (en ese orden temporal).

Cada escala tiene sus propias características y objetivos, mismos que son tratados en el área de ingeniería de procesos, sin embargo al hablar de biorreactores se hace una distinción en tamaños, forma de operación y configuración geométrica.

El biorreactor puede considerarse como el corazón de todo proceso biotecnológico, ya que en él se lleva a cabo la transformación de la materia prima al producto de interés y su operación deberá garantizar la maximización en la conversión, por lo que su funcionamiento es de vital importancia en la rentabilidad del bioproceso, sobre todo en aquellos catalogados como de “altos volúmenes de producción y bajo valor agregado” (Vazquez, Orazco, Ordaz, & Garcia, 2007).

## **2.11 PRINCIPIOS DEL DISEÑO DE UN BIORREACTOR**

Los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado “fermentador”), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure la homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Es importante tomar en cuenta los problemas de transferencia de calor y oxígeno sobre la cama de sustrato, los cuales

dependen de las características de la matriz que se esté utilizando para la fermentación, siendo éste, uno de los principales factores que afectan el diseño y las estrategias de control (Ruiz, Rodriguez, Contreras, & Aguilar, 2007).

### **2.11.1 OBJETIVOS PRINCIPALES DE LOS BIORREACTORES**

Los objetivos del biorreactor son de mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen del cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación, mantener constante la temperatura, suministrar oxígeno a una velocidad precisa con el microorganismo y conservar el cultivo puro, es decir que una vez que sea esterilizado el equipo y sembrado el microorganismo, no permita contaminación, para cumplir estos objetivos, el biorreactor deberá ser hermético, con un sistema de agitación, y en algunos casos un sistema de inyección de aire (Merchuck, 1993).

Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo dependiendo del tipo de biorreactor y la fermentación a utilizar:

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante numerosos días, para evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.
- El consumo de energía debe de ser el mínimo posible.
- Entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado Ruiz et al. (2007).

## 2.11.2 BIORREACTORES MÁS UTILIZADOS A NIVEL DE LABORATORIO

Tabla 6. Tipos de biorreactores

BIORREACTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>ESCALA A NIVEL DE LABORATORIO</b>		
COLUMNA	Económico, fácil montaje, monitoreo y control humedad, temperatura, biomasa y CO <sub>2</sub> . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O <sub>2</sub> , dificultad en la toma de muestra y problemas en la eliminación de calor.
COLUMNA ESTÉRIL	Control de humedad y temperatura. Sistema de esterilización previo inoculación y toma de muestra.	Formación de gradientes de concentración de O <sub>2</sub> y nutrientes.
TAMBOR HORIZONTAL	Mayor aireación y mezclado del sustrato. Existen varios diseños con modificaciones.	Daño de estructura micelial. Dificultad en el control de temperatura y humedad. Poco volumen utilizado en el tambor.
ZYMOTIS	Mejor transferencia de calor	Problemas de asepsia en el proceso. Mayor compactación de la cama de sustrato
GROWTEK	Facilidad en la toma de muestra. Mayor contacto entre el medio de cultivo y el soporte sólido. Menor acumulación de calor en la cama de sustrato.	No cuenta con un sistema de aireación. Solo se pueden manejar una sola carga de 400 mL de medio líquido por fermentación.
PROCESO CONTINUO	Menor tiempo de residencia. Mejor mezclado y crecimiento fúngico. Mayor asepsia.	Transferencia no homogénea de calor. Aglomeración de células por rompimiento micelial.
COLUMNA O CHAROLA	Económico. Alta transferencia de O <sub>2</sub> y aireación. Mayor transferencia de nutrientes. Fácil remoción de temperaturas elevadas.	Primer Prototipo. Optimizar la cantidad y tamaño de charolas en el volumen del cilindro.

Fuente. Ruiz et al. (2007)

### 2.11.3 EJEMPLOS DE BIORREACTORES A NIVEL DE LABORATORIO

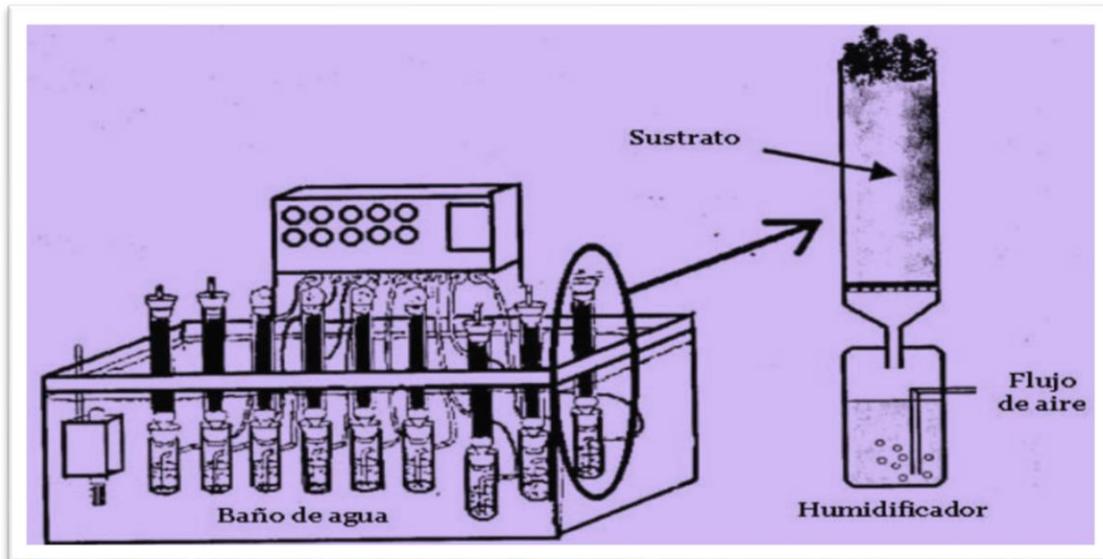


Figura 5. Biorreactores en columna

Fuente. Ruiz et al. (2007)

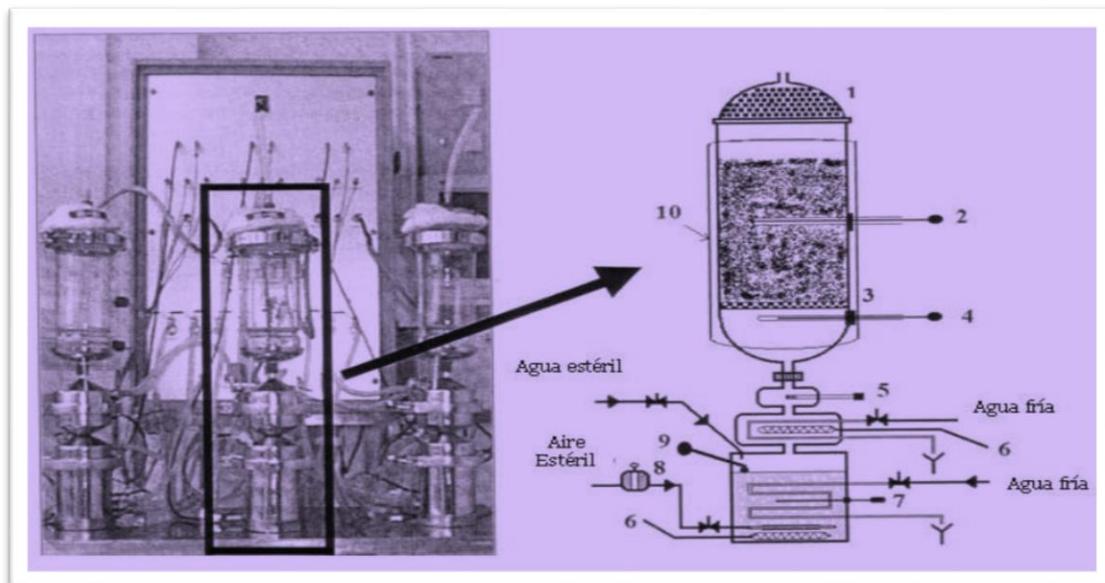


Figura 6. Biorreactor estéril

Fuente. Ruiz et al. (2007)

Existe un gran interés por llevar a cabo diseño de biorreactores a nivel laboratorio que puedan ser escalados para su uso a nivel industrial, por lo que se han llevado a cabo investigaciones para determinar los aspectos de ingeniería que afectan a la fermentación en medio sólido ya que es un sistema denominado de las tres E's: energético, económico y ecológico.

Por lo que, las principales investigaciones en esta área se han estado llevando a cabo, principalmente, en Asia debido a su gran interés de aprovechar sus residuos agroindustriales, además de los altos rendimientos de productividad que se obtienen a partir de estos bioprocesos y en algunos casos mayores que los reportados por fermentación en medio líquido (Bastea, Doppler, Pearce, Durand, Spratley, & Storz, 2013).

## **2.12 DISEÑO EXPERIMENTAL $2^k$**

Los diseños experimentales son importantes ya que le permiten al investigador mejorar un proceso o sistema por medio de la observación de cambios en ellos a través de un experimento. Para lo cual, el investigador necesita de herramientas estadísticas para poder experimentar y obtener resultados que signifiquen una mejora, una corrección o una estabilización en ese proceso o sistema.

El diseño  $2^3$ , consta de tres factores con dos niveles respectivos para cada factor por lo tanto es un diseño  $2^k$  donde  $k=3$ , los dos niveles de los factores se representan con los signos  $-$  y  $+$ , o con los valores  $-1$  y  $+1$  (o simplemente 1). Para los factores cuantitativos el signo  $-$  representa al factor en su nivel bajo y el signo  $+$ , en su nivel alto. Para los factores cualitativos, la asignación de los signos  $-$  y  $+$  a cada nivel se realiza de forma arbitraria, Todas las expresiones contenidas en un conjunto ortogonal tienen interpretación. En el experimento  $2^3$ , el conjunto de contrastes ortogonales está constituido por los efectos principales (A, B y C), las interacciones dobles (AB, AC, BC) y la interacción triple (ABC), por lo general el interés se enfoca en estudiar los efectos principales y las interacciones dobles. También contiene la identidad (que no es contraste), el modelo matemático de efectos fijos del diseño  $2^k$  se representa simbólicamente como:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + nR + E_{ijkn}$$

Donde  $\mu$  es una media global, E es un término del error aleatorio, R es el número de réplicas, las letras mayúsculas representan los efectos principales y las interacciones de los factores.

### 2.12.1 ILUSTRACIÓN GRÁFICA DEL DISEÑO $2^k$

Se trata de un diseño factorial  $2^3$ , y tiene ocho combinaciones de los niveles de los factores. Geométricamente, el diseño es un cubo como el que se muestra en la Figura 7 a, donde las ocho corridas forman los vértices del cubo. En la Figura 7 b, se muestran las ocho corridas en forma tabular al que es común llamar la matriz de prueba (Montgomery, 2013).

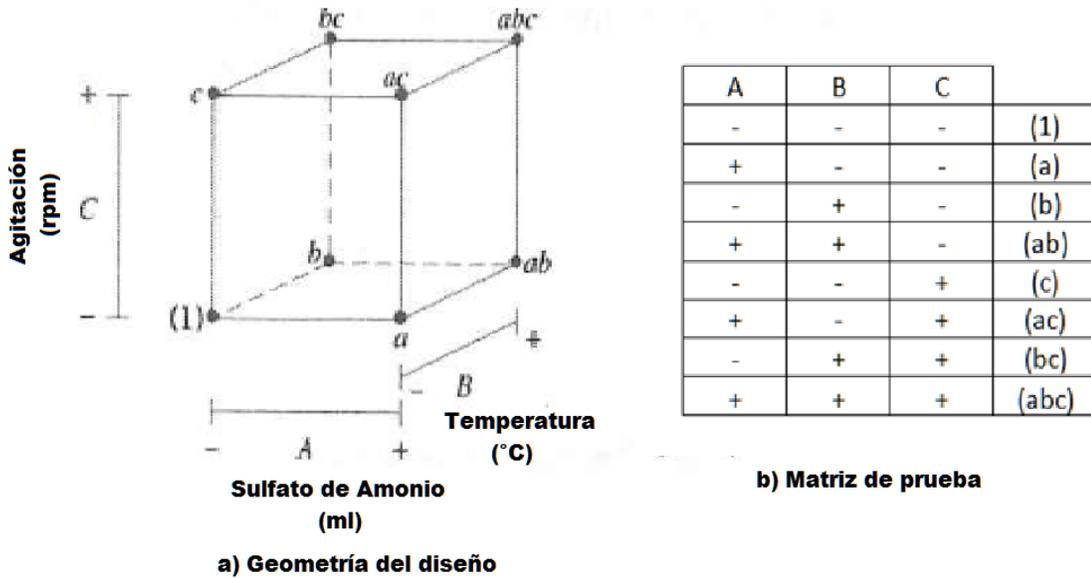


Figura 7. Diseño factorial  $2^3$

### 2.12.2 ANÁLISIS DEL DISEÑO FACTORIAL

Los efectos principales pueden estimarse con facilidad. Hay que recordar que las letras minúsculas (1), a, b, ab, c, ac, bc y abc representan el total de las, n réplicas en cada una de las ocho corridas del diseño. Con referencia a la Tabla 7, el efecto principal de A, se estimaría promediando las cuatro corridas de la parte derecha del cubo donde A está en el nivel alto y restando de esa cantidad el promedio de las cuatro corridas de la parte izquierda del cubo donde A esta en el nivel bajo. Se obtiene así:

**Contraste A** =  $[a+ab+ac+abc-(1) -b -c-bc]$  ecuación (3-5-3-1)

**Contraste B** =  $[b+ab+bc+abc-(1) -a -c-ac]$  ecuación (3-5-3-2)

**Contraste C** =  $[c+ac+bc+abc-(1) -a -b-ab]$  ecuación (3-5-3-3)

**Contraste AB** =  $[ab+abc+(1)+c -b -a -bc-ac]$  ecuación (3-5-3-4)

**Contraste AC** =  $[(1)+b+ac+abc -a -ab -c-bc]$  ecuación (3-5-3-5)

**Contraste BC** =  $[(1)+a+bc+abc -b -ab -c-ac]$  ecuación (3-5-3-6)

**Contraste ABC** =  $[abc+c+b+a -bc -ac -ab-(1)]$  ecuación (3-5-3-7)

### 2.12.3 REPRESENTACIÓN GEOMÉTRICA DE LOS CONTRASTES

Se pueden representar de forma geométrica a los contrastes, para ser visualizados desde todo punto de vista, así se puede observar cuáles son sus niveles bajos y altos.

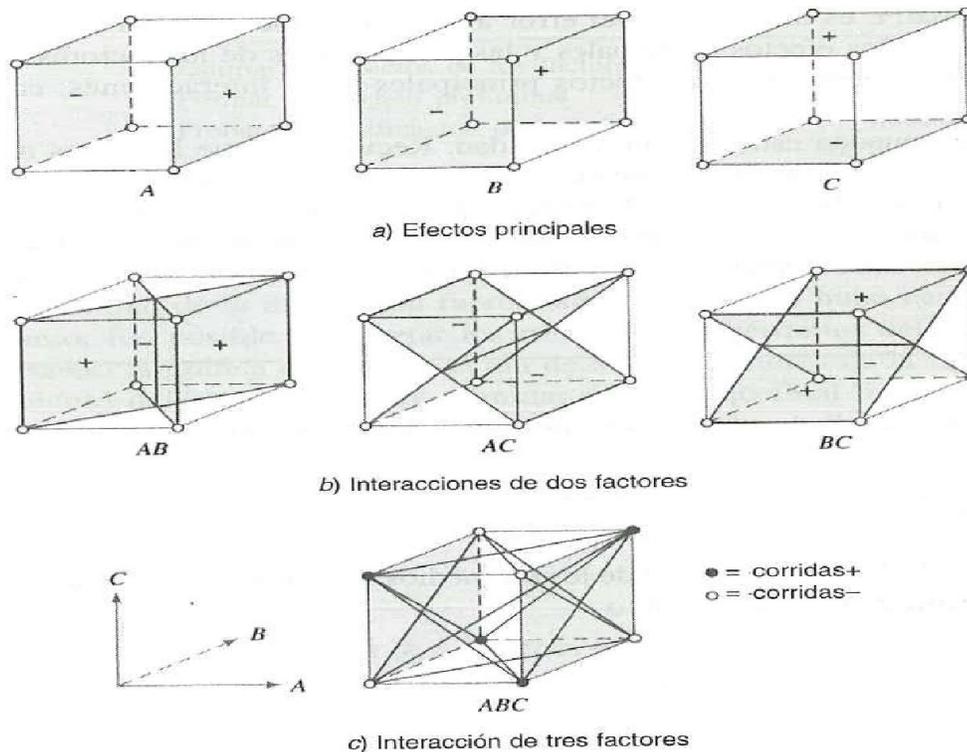


Figura 8. Representación geométrica del diseño  $2^3$

### 2.12.4 MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTAL 2<sup>3</sup>

Todas las expresiones contenidas en un conjunto ortogonal tienen interpretación. En el experimento 2<sup>3</sup>, el conjunto de contrastes ortogonales está constituido por los efectos principales A, B y C, las interacciones dobles AB, AC y BC, y la interacción triple ABC. También contiene la identidad (que no es contraste). La Tabla 7, contiene el conjunto de los siete contrastes ortogonales de 2<sup>3</sup>, su identidad y con las combinaciones de tratamientos que intervienen en las expresiones, para verificar que efectivamente miden lo que se señala con el símbolo con que se designa cada contraste. La tabla permite efectuar los productos. Se denomina Matriz de Diseño del experimento 2<sup>3</sup>.

Tabla 7. Matriz de diseño experimental 2<sup>3</sup>

Corrida	Combinaciones	Identidad	Contrastes						
		I	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
1	(1)	+	-	-	+	-	+	+	-
2	a	+	+	-	-	-	-	+	+
3	b	+	-	+	-	-	+	-	+
4	ab	+	+	+	+	-	-	-	-
5	c	+	-	-	+	+	-	-	+
6	ac	+	+	-	-	+	+	-	-
7	bc	+	-	+	-	+	-	+	-
8	abc	+	+	+	+	+	+	+	+

Si se hacen n réplicas de cada tratamiento, los efectos de un diseño 2<sup>3</sup> se estiman dividiendo los contrastes entre 4n. Por ejemplo, el efecto principal de A se estima de la siguiente manera:

$$\text{Efecto A} = \frac{\text{Contraste A}}{n2^k} \quad \text{ecuación (3-5-3-8)}$$

También las sumas de los cuadrados de los efectos se calculan a partir de sus contrastes con la siguiente fórmula,

$$SC_{\text{efecto}} = \frac{(\text{Contraste efecto})^2}{n2^k} \quad \text{ecuación (3-5-3-9)}$$

La suma total de cuadrados se obtiene de la manera usual como:

$$SC_T = \sum^2 \sum^2 \sum^2 \sum^2 y^2 - \frac{y^2}{n2^k} \quad \text{ecuación (3-5-3-10)}$$

Y por último, la suma de cuadrados del error se calcula por sustracción. Con esta información se obtiene el ANOVA para el diseño  $2^3$ . Aquellos efectos cuyos valores  $-p$  son menores a  $\alpha=0.05$  se consideran activos y son los efectos a interpretar para conocer mejor cómo está operando el proceso y para determinar el mejor tratamiento. También hay que recordar que mientras menor sea el valor de  $-p$  para un efecto, significa que éste tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta.

Para calcular el cuadrado medio del error se requieren al menos dos repeticiones, puesto que la  $SC_E$  tiene 0 grados de libertad cuando  $n=1$ . Entonces se recomienda correr este diseño con al menos dos réplicas para contar con suficientes grados de libertad para el error (Gutierrez & De la Vara, 2008).

### 2.12.5 ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA

El modelo de regresión puede usarse para predecir el acabado superficial en cualquier punto de la región experimental original, en general, un modelo de regresión es una ecuación de la forma

$$y = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \dots + \beta_k\chi_k + \varepsilon$$

$$y = \beta_0 + (A/2)\chi_1 + (B/2)\chi_2 + (C/2)\chi_3 + (AB)\chi_1\chi_2 + \varepsilon \quad \text{ecuación (3-5-4-1)}$$

$$\varepsilon = \sqrt{CM \text{ error} / n2^{k-2}}$$

donde  $y$  es la variable respuesta, las  $\chi$  son un conjunto de variables regresoras o predictoras, las  $\beta$  son los coeficientes de regresión y  $\varepsilon$  es un término del error. El modelo de regresión se puede obtener simplemente eliminando el término de interacción del modelo original. Esto solo puede hacerse si las variables del diseño experimental son ortogonales, como es el caso en un diseño  $2^3$ . A este tipo de representación se le llama **gráfica de superficie de respuesta**, y al modelo de regresión que se utiliza para generar la gráfica con frecuencia se le llama **modelo de superficie de respuesta de primer orden**.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 EQUIPOS

- Biorreactor (capacidad 5 litros)
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza analítica
- pH metro
- Cronómetro
- Calentador de agua
- Centrífuga
- Microscopio
- Cámara de Neubauer

## 3.2 MATERIALES

Material	Unidades	Dimensiones/Capacidad	Cantidad
Cajas Petri	mm	100x15	24
Erlenmeyer	ml	1000	2
Frascos tapa rosca	ml	1000	2
Vasos de Precipitación	ml	1000	2
Tubos de ensayo	ml	20	24
Probeta	ml	200	1
Termómetro de alcohol	°C		1
Envases plásticos	ml	50	24

- Equipos de protección (Mandil, Mascarilla, Guantes de látex)

### 3.3 MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Fuente de carbono, lactosuero
- Fuente de nitrógeno; Sulfato de Amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Ácido tri cloro acético (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)
- Agua destilada

### 3.4 MÉTODOS

#### 3.4.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en dos zonas, la primera etapa en el sector de Yacucalle, y la segunda etapa en los laboratorios de análisis físico-químico y microbiológico de la Universidad Técnica del Norte, en la F.I.C.A.Y.A.

**Tabla 8.** Ubicación del experimento

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Altitud	2,192 metros
Temperatura media	23°C

Fuente. (INAMHI, 2014)

### 3.5 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

A partir del procesamiento de la leche se obtiene una gran variedad de productos y subproductos dentro de los cuales se encuentra el lactosuero. Este elemento a pesar de ser rico en nutrientes para el ser humano, no se ha desarrollado una tendencia muy marcada para su utilización y aprovechamiento en lo que respecta a la salud, desperdiciando entonces los altos niveles de proteína que este guarda, por el contrario está siendo desechado de manera descontrolada, causando además contaminación ambiental.

El biorreactor puede ser diseñado acorde a las necesidades establecidas para el tipo de proceso que se llevará a cabo, se puede incluir elementos para el mezclado, control de temperatura,

suministro de oxígeno y nutrientes, salida para la toma de muestras, control de pH, etc. Para el diseño de los biorreactores se debe tener en cuenta además de la velocidad de reacción, la tasa de transferencia de oxígeno, dependiendo si el proceso de fermentación es aerobio o anaerobio.

Según González (2010) la combinación de procesos con biorreactores y las facultades fermentativas de algunos microorganismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* permite obtener el máximo rendimiento en la producción de lacto proteínas encontradas en el suero de quesería, proteínas como Lacto albumina y la Lacto globulina cuyo contenido de aminoácidos esenciales azufrados (cisteína y metionina) las hacen un factor importante para la nutrición humana. Estos biorreactores pueden ser tanques o recipientes de acero inoxidable, conformados por un eje vertical que produce una mezcla completa y homogénea de los elementos dentro del mismo, bien sea con flujos radiales, axiales o rotativos (este factor dependerá del tipo de reacción que se busque dentro del proceso).

### 3.5.1 DISEÑO DEL PROYECTO

El diseño que se utilizó en el proceso de elaboración de proteína unicelular a partir del suero de leche, tuvo como finalidad la optimización de parámetros de operación, como es la cantidad de sulfato de amonio (factor A), temperatura (factor B), y agitación (factor C), manteniendo constante el pH. Considerando a la variable respuesta como la cantidad de microorganismos, Unidades Formadoras de Levaduras (UFL).

A continuación se muestran los factores y los niveles, alto y bajo que se utilizaron para la optimización de proteína unicelular a partir del lacto suero.

### 3.5.2 FACTORES Y NIVELES

**Tabla 9.** Factores que influyen en el proyecto

FACTOR A		FACTOR B		FACTOR C	
Sulfato de amonio (ml)		Temperatura (°C)		Agitación (rpm)	
Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
100	150	25	30	200	300

## **3.6 PROCEDIMIENTO**

### **3.6.1 SUERO DE QUESO UTILIZADO**

En la presente investigación se utilizó suero de leche con un pH de 4,3 residual de la fabricación de queso fresco.

El proceso de elaboración del queso fresco, parte de la leche entera, en donde se realiza una coagulación utilizando cultivo, cuajo y ácido, el producto obtenido luego del desuerado es salado, moldeado, posteriormente prensado, para luego ser consumido en su estado fresco.

El suero de leche se tomó directamente de la tina de desuerado y fue transportado en recipientes de 20 litros previamente lavados y esterilizados. **ANEXO G.**

### **3.6.2 TIPO DE LEVADURA Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

*Saccharomyces cerevisiae*: Levadura seca instantánea. Almacenado a temperatura ambiente de 25°C.

### **3.6.3 EQUIPO DE FERMENTACIÓN**

Se utilizó un biorreactor, diseñado especialmente para este tipo de fermentaciones, el cual consta de un frasco de fermentación, capacidad de 5 litros, en cuyo interior se encuentra el agitador que es controlado por un rotor, unidades de toma de muestra, inoculación y salida de gases, un recirculador de agua, un termómetro y un pH metro, para el control de la acidez y salinidad.

### **3.6.4 PRE TRATAMIENTO DEL LACTOSUERO**

Se tomaron muestras de 2200 ml de lactosuero a esta muestra se le agrego 28 ml de Ácido tricloro acético al 10% de concentración, seguidamente se llevó a ebullición. Luego se enfrió, se decantó y se filtró, quedando un volumen de 2000 ml de lacto suero desproteinizado.

### **3.6.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN**

En este proceso los 2000 ml de lactosuero desproteinizado fueron introducidos en el biorreactor manteniendo el pH en 4,5 a una temperatura de 25°C y 200 rpm, en esta solución se agregaron 100 ml de Sulfato de Amonio y 10 ml de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae*).

El mismo procedimiento se realizó con 150 ml de Sulfato de Amonio, 30°C de Temperatura y 300 rpm, se mantuvo el proceso fermentativo por un lapso de 22 horas realizando 3 repeticiones a cada tratamiento.

Se tomó muestras de la solución a los 15, 30 minutos, 1 hora y luego cada 2 horas, hasta completar las 22 horas de trabajo, usando la cámara de Neubauer se realizó el recuento de la población de levaduras.

Para cada tratamiento se realizó una curva gráfica de crecimiento, tomando en consideración (tiempo vs crecimiento microbiano), en donde se muestran sus 3 fases: latencia, estacionaria y muerte.

### 3.6.5.1 Recuento total de microorganismos (m/o)

Se toma 0,1 ml de la solución y se coloca en la cámara de Neubauer, se asienta el cubre objetos, para ser observada al microscopio. Se busca el primer cuadro para realizarse el recuento, posteriormente se toma lectura de 10 cuadros de 1 mm<sup>2</sup> ya sea en forma diagonal o en forma de cruz, como muestra la Figura 9, se registra los datos y por medio de la ecuación (3-5-3-12) se calcula el número de Unidades Formadoras de Levaduras (UFL) (Bastidas, 2008).

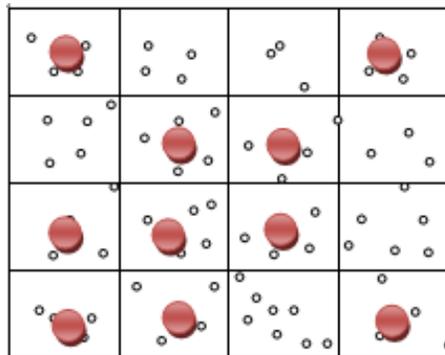


Figura 9. Recuento en la cámara de Neubauer

$$\frac{x \text{ levaduras}}{y \text{ cuadros}} * \frac{\# \text{ cuadros}}{\text{vol cámara}} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} = \frac{x \text{ millones de levaduras}}{\text{ml}} \quad \text{ecuación (3-5-3-12)}$$

Volumen útil de la cámara Neubauer improved = 0.2mm x 0.2mm x 0,1mm x 25 = 0,1 mm<sup>3</sup>

### 3.6.5.2 Determinación de la curva de crecimiento

Para realizar las curvas de crecimiento se emplea la siguiente fórmula.

$$Ln = N_0 + \frac{ln2}{T} \quad \text{ecuación (3-6-5-1)}$$

**Donde:**

**N<sub>0</sub>**= Incremento de levaduras

**T**= Tiempo total de fermentación (22 horas)

### 3.6.6 RENDIMIENTO DE LA BIOMASA

Una vez alcanzada la fase estacionaria se tomaron muestras de 40ml de la biomasa, en tubos plásticos y se procede a la centrifugación a 3000 rpm por un lapso de 30 minutos.

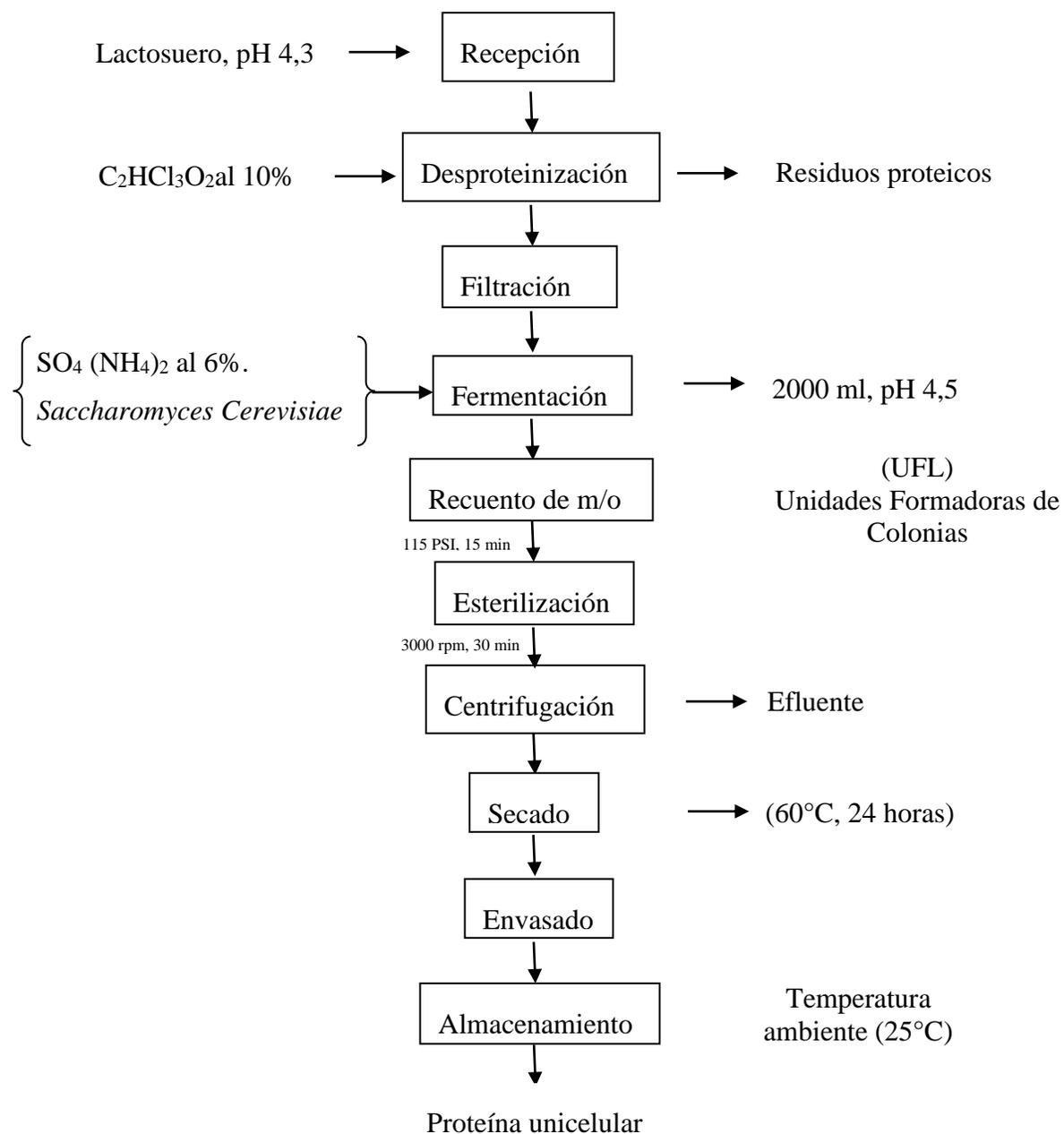
Terminada la centrifugación el efluente puede ser vertido con mínimos problemas de contaminación y lo que queda se coloca en cajas petri las cuales son secadas en la estufa a 60 °C, hasta llegar a un peso constante.

Se calcula el rendimiento, por medio de un balance de materiales.

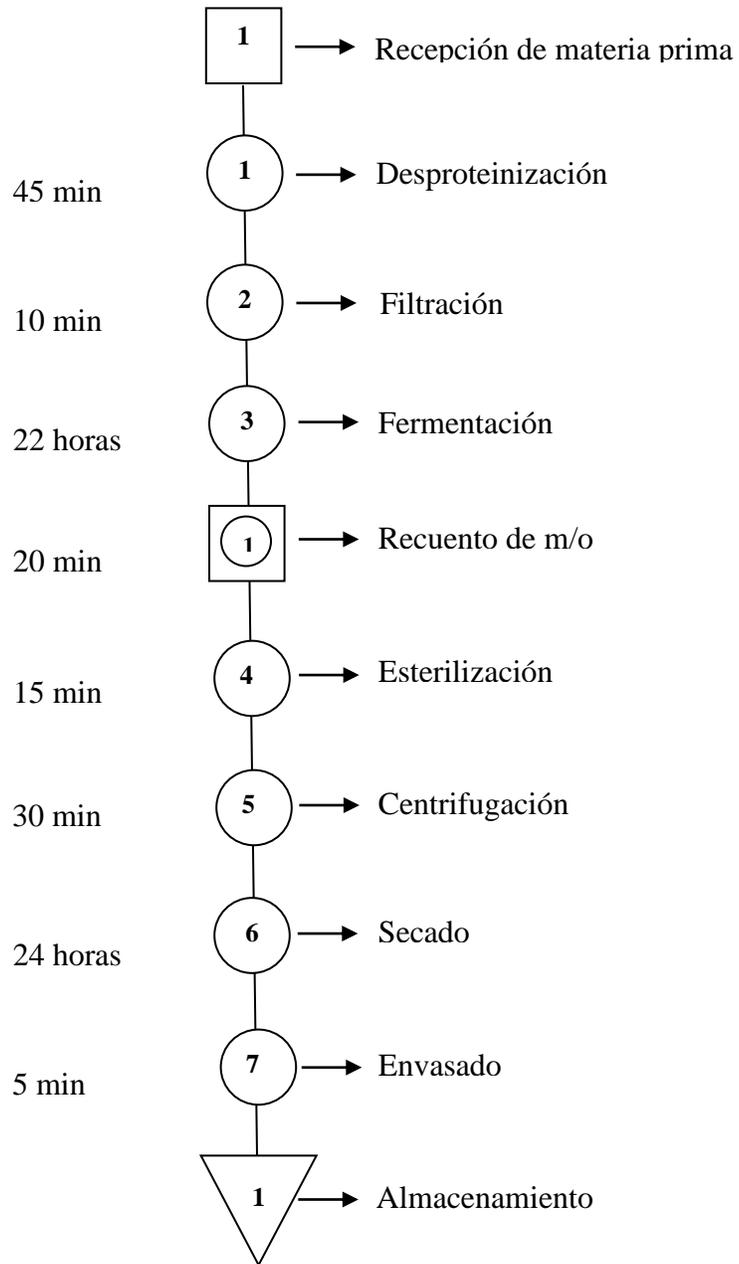
### 3.7 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

#### 3.7.1 DIAGRAMA OPERACIONAL DE PROCESO

##### 3.7.1.1 Diagrama de bloques para la obtención de proteína unicelular a partir del lacto suero



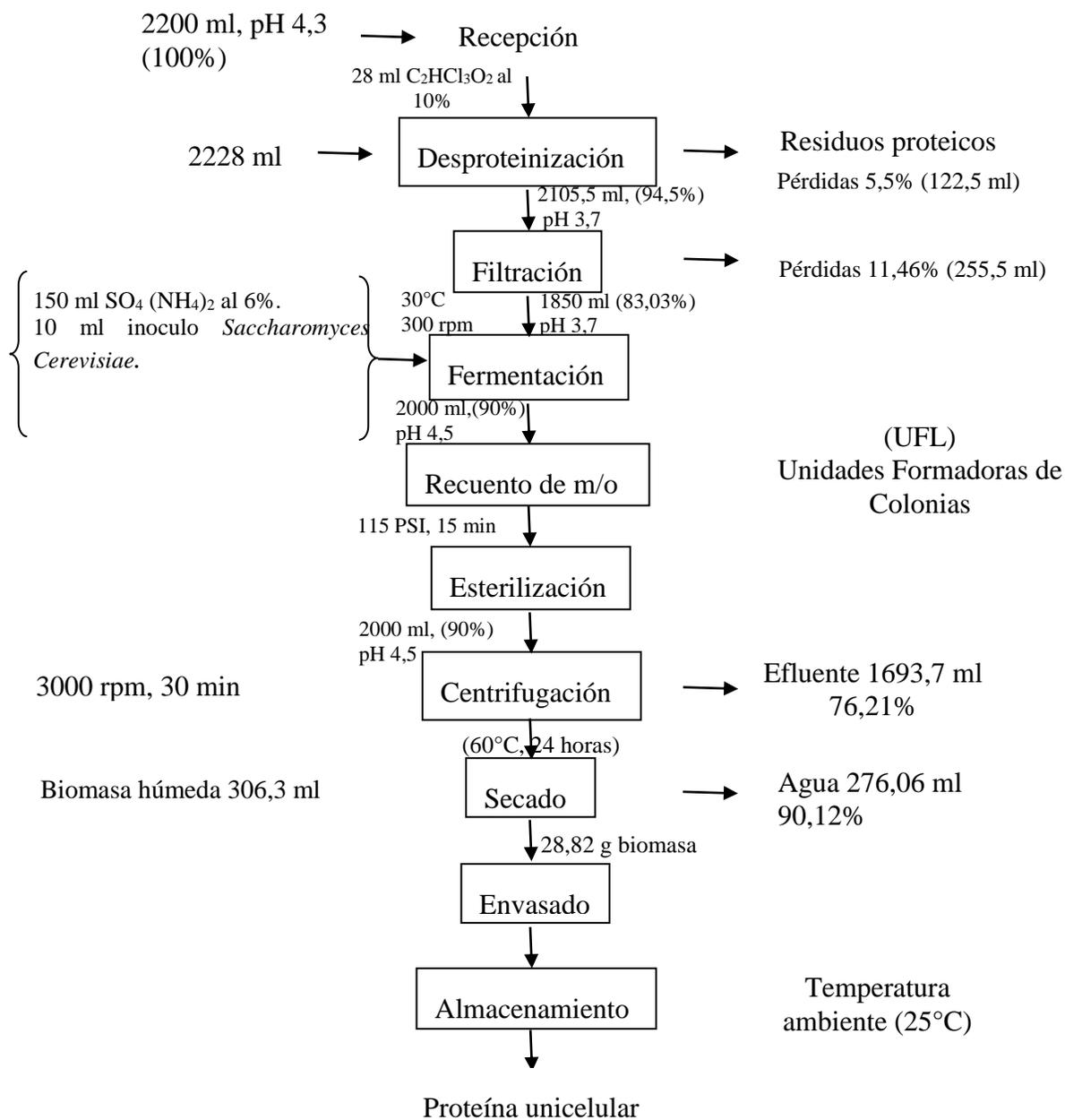
### 3.7.1.2 Diagrama de flujo para la obtención de proteína unicelular a partir del lacto suero



Tiempo total: 48 horas 5 minutos

# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## 4.1 BALANCE DE MATERIALES



$$\text{Rendimiento} = \text{PP/PT} \cdot 100$$

$$\text{Rendimiento} = 28,82\text{g}/2048\text{g} \cdot 100$$

$$\text{Rendimiento} = 1,37\%$$

#### 4.1.1 COSTOS DE PRODUCCIÓN

Para producir 100g de proteína unicelular se ha realizado un balance de costos, los cuales están desglosados en el siguiente cuadro.

<b>Balance de materiales para la producción de proteína unicelular (100g)</b>				
		<b>unidades</b>	<b>cantidad</b>	<b>valor total (USD)</b>
Materia prima	Lactosuero	l	7	0,07
Insumos	Levadura S.C	g	3,5	0,05
Reactivos	Ácido tri cloro acético	g	1,43	0,73
	Sulfato de amonio	g	4,62	0,35
	Hidróxido de sodio	ml	1,46	0,12
	Ácido sulfúrico	ml	1,17	0,23
Otros	luz eléctrica	Kwh	(2,5días) 5,83	0,45
	agua potable	m3	0,5	0,41
total				2,40

## 4.2 RECUENTO TOTAL DE MICROORGANISMOS

Tabla 10. Tratamiento (1)

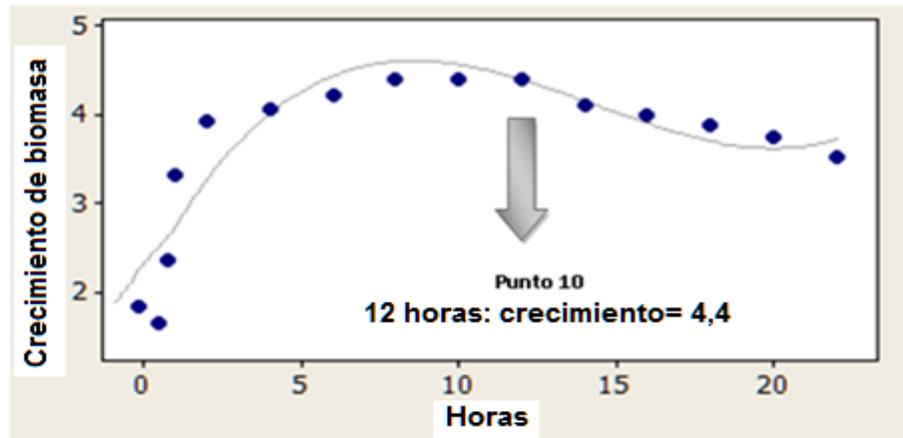
REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECUENTO m/o (UFL)	HORAS	RECUENTO m/o (UFL)	HORAS	RECUENTO m/o (UFL)
0,25	4	0,15	6	0,15	2
0,50	11	0,3	8	0,3	20
1	27	1	19	1	20
2	49	2	41	2	44
4	56	4	42	4	45
6	65	6	47	6	48
8	78	8	50	8	50
10	79	10	53	10	52
12	79	12	57	12	54
14	59	14	62	14	27
16	52	16	44	16	25
18	47	18	33	18	22
20	41	20	18	20	20
22	33	22	18	22	17
<b>TOTAL</b>	<b>680</b>		<b>498</b>		<b>446</b>

SUMATORIA DE REPETICIONES	
Repetición 1	680
Repetición 2	498
Repetición 3	446
<b>Total</b>	<b>1624</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (1)

<b>REPETICIÓN 1</b>				
<b>PUNTOS</b>	<b>HORAS</b>	<b>RECuento m/o (UFL)</b>	<b>POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)</b>	<b>LOG DE POBLACIÓN</b>
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	4	1600000	1,417
3	0,50	11	4400000	2,42
4	1	27	10800000	3,32
5	2	49	19600000	3,92
6	4	56	22400000	4,05
7	6	65	26000000	4,2
8	8	78	31200000	4,38
9	10	79	31600000	4,4
10	12	79	31600000	4,4
11	14	59	23600000	4,1
12	16	52	20800000	3,98
13	18	47	18800000	3,88
14	20	41	16400000	3,74
15	22	33	13200000	3,52

**Curva de crecimiento de biomasa Vs tiempo**



**Gráfico 1. Tratamiento (1)**

El Gráfico 1 muestra que a las 12 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (4,4), en condiciones de (100 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ , 25°C y 200 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

**Tabla 11.** Tratamiento (a)

REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECUENTO m/o (UFL)	HORAS	RECUENTO m/o (UFL)	HORAS	RECUENTO m/o (UFL)
0,15	6	0,15	4	0,15	9
0,3	17	0,3	14	0,3	14
1	42	1	35	1	38
2	61	2	68	2	72
4	65	4	72	4	73
6	79	6	78	6	77
8	81	8	84	8	80
10	84	10	87	10	96
12	89	12	61	12	64
14	92	14	60	14	58
16	69	16	56	16	54
18	40	18	38	18	41
20	32	20	32	20	29
22	21	22	23	22	26
<b>TOTAL</b>	<b>778</b>		<b>712</b>		<b>731</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	778
Repetición 2	712
Repetición 3	731
<b>Total</b>	<b>2221</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (a)

<b>REPETICIÓN 3</b>				
<b>PUNTOS</b>	<b>HORAS</b>	<b>RECUENTO m/o (UFL)</b>	<b>POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)</b>	<b>LOG DE POBLACIÓN</b>
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	9	3600000	2,22
3	0,50	14	5600000	2,67
4	1	38	15200000	3,66
5	2	72	28800000	4,59
6	4	73	29200000	4,32
7	6	77	30800000	4,37
8	8	80	32000000	4,41
9	10	96	38400000	4,59
10	12	64	25600000	4,19
11	14	58	23200000	4,09
12	16	54	21600000	4,02
13	18	41	16400000	3,74
14	20	29	11600000	3,39
15	22	26	10400000	3,28

**Curva de crecimiento de biomasa Vs tiempo**



**Gráfico 2. Tratamiento (a)**

El Gráfico 2 muestra que a las 10 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (4,59), en condiciones de (150 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ , 25°C y 200 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

**Tabla 12.** Tratamiento (b)

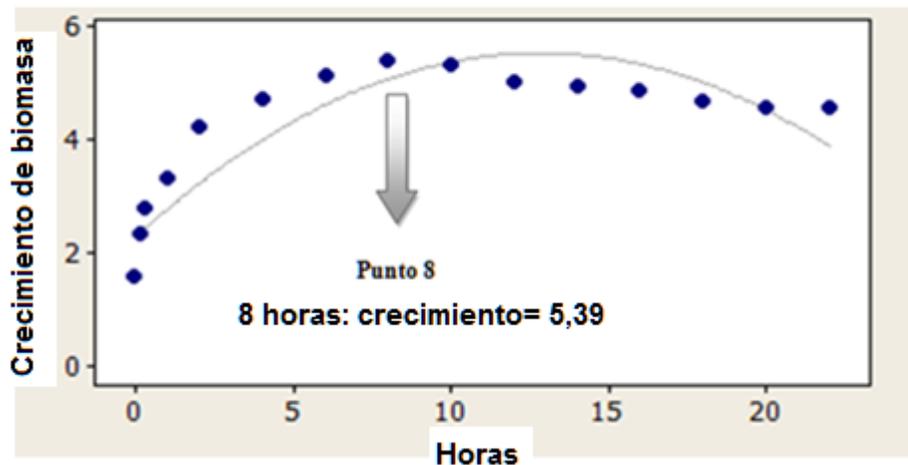
REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECUENTO m/o (UFL)	HORAS	RECUENTO m/o (UFL)	HORAS	RECUENTO m/o (UFL)
0,25	6	0,15	7	0,15	10
0,50	12	0,3	11	0,3	16
1	29	1	30	1	27
2	61	2	56	2	66
4	88	4	109	4	107
6	132	6	142	6	166
8	173	8	199	8	213
10	203	10	199	10	200
12	149	12	173	12	148
14	144	14	160	14	135
16	135	16	134	16	127
18	111	18	114	18	104
20	113	20	101	20	94
22	86	22	95	22	94
<b>TOTAL</b>	<b>1442</b>		<b>1530</b>		<b>1507</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	1442
Repetición 2	1530
Repetición 3	1507
<b>Total</b>	<b>4479</b>

**MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (b)**

<b>REPETICIÓN 3</b>				
<b>PUNTOS</b>	<b>HORAS</b>	<b>RECUENTO m/o (UFL)</b>	<b>POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)</b>	<b>LOG DE POBLACIÓN</b>
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	10	4000000	2,33
3	0,50	16	6400000	2,8
4	1	27	10800000	3,32
5	2	66	26400000	4,22
6	4	107	42800000	4,7
7	6	166	66400000	5,14
8	8	213	85200000	5,39
9	10	200	80000000	5,32
10	12	148	59200000	5,02
11	14	135	54000000	4,93
12	16	127	50800000	4,87
13	18	104	41600000	4,67
14	20	94	37600000	4,57
15	22	94	37600000	4,57

**Curva de crecimiento de biomasa Vs tiempo**



**Gráfico 3. Tratamiento (b)**

El Gráfico 3 muestra que a las 8 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (5,39), en condiciones de (100 ml SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 30°C y 200 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

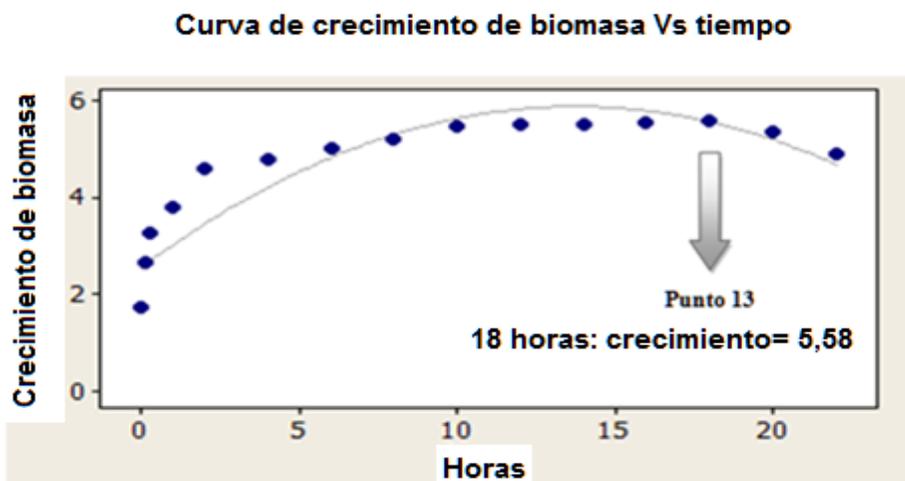
**Tabla 13.** Tratamiento (ab)

REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)
0,25	14	0,15	16	0,15	16
0,50	25	0,3	29	0,3	29
1	42	1	38	1	39
2	98	2	109	2	83
4	119	4	113	4	114
6	147	6	140	6	139
8	176	8	172	8	176
10	234	10	229	10	215
12	238	12	234	12	223
14	244	14	236	14	232
16	249	16	253	16	246
18	257	18	264	18	252
20	209	20	188	20	204
22	133	22	132	22	140
<b>TOTAL</b>	<b>2185</b>		<b>2153</b>		<b>2153</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	2185
Repetición 2	2153
Repetición 3	2153
<b>Total</b>	<b>6491</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (ab)

<b>REPETICIÓN 1</b>				
<b>PUNTOS</b>	<b>HORAS</b>	<b>RECuento m/o (UFL)</b>	<b>POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)</b>	<b>LOG DE POBLACIÓN</b>
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	14	5600000	2,67
3	0,50	25	10000000	3,25
4	1	42	16800000	3,8
5	2	98	39200000	4,61
6	4	119	47600000	4,81
7	6	147	58800000	5,02
8	8	176	70400000	5,2
9	10	234	93600000	5,48
10	12	238	95200000	5,5
11	14	244	97600000	5,52
12	16	249	99600000	5,54
13	18	257	102800000	5,58
14	20	209	83600000	5,37
15	22	133	53200000	4,92



**Gráfico 4.** Tratamiento (ab)

El Gráfico 4 muestra que a las 18 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (5,58), en condiciones de (150 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ ,  $30^\circ\text{C}$  y 200 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

**Tabla 14.** Tratamiento (c)

REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)
0,25	7	0,15	9	0,15	12
0,50	19	0,3	21	0,3	23
1	36	1	38	1	41
2	73	2	69	2	76
4	92	4	80	4	74
6	98	6	94	6	91
8	104	8	101	8	106
10	111	10	105	10	105
12	119	12	107	12	110
14	123	14	114	14	109
16	129	16	117	16	120
18	128	18	127	18	127
20	104	20	105	20	99
22	81	22	89	22	90
<b>TOTAL</b>	<b>1224</b>		<b>1176</b>		<b>1183</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	1224
Repetición 2	1176
Repetición 3	1183
<b>Total</b>	<b>3583</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (c)

<b>REPETICIÓN 1</b>				
PUNTOS	HORAS	RECuento m/o (UFL)	POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)	LOG DE POBLACIÓN
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	7	2800000	1,97
3	0,50	19	7600000	2,97
4	1	36	14400000	3,61
5	2	73	29200000	4,32
6	4	92	36800000	4,55
7	6	98	39200000	4,61
8	8	104	41600000	4,67
9	10	111	44400000	4,74
10	12	119	47600000	4,581
11	14	123	49200000	4,84
12	16	129	51600000	4,89
13	18	128	51200000	4,88
14	20	104	41600000	4,67
15	22	81	32400000	4,42

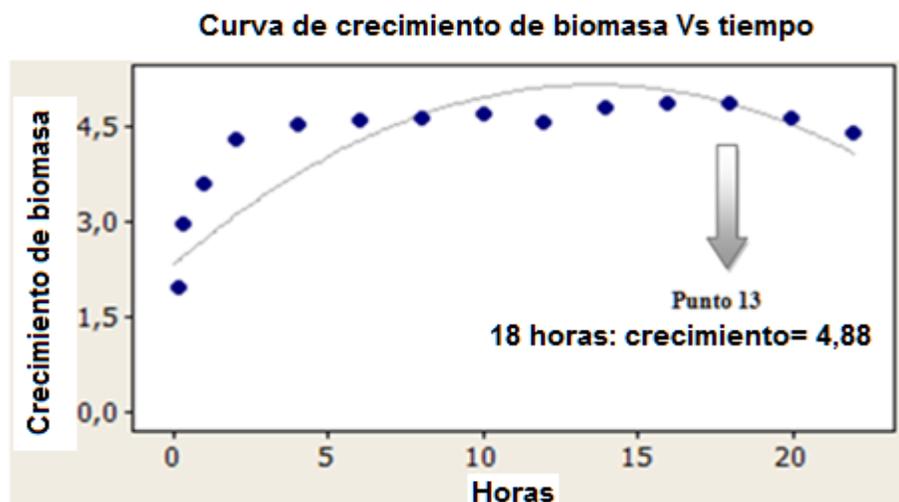


Gráfico 5. Tratamiento (c)

El Gráfico 5 muestra que a las 18 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (4,88), en condiciones de (100 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2, 25^\circ\text{C}$  y 300 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

**Tabla 15.** Tratamiento (ac)

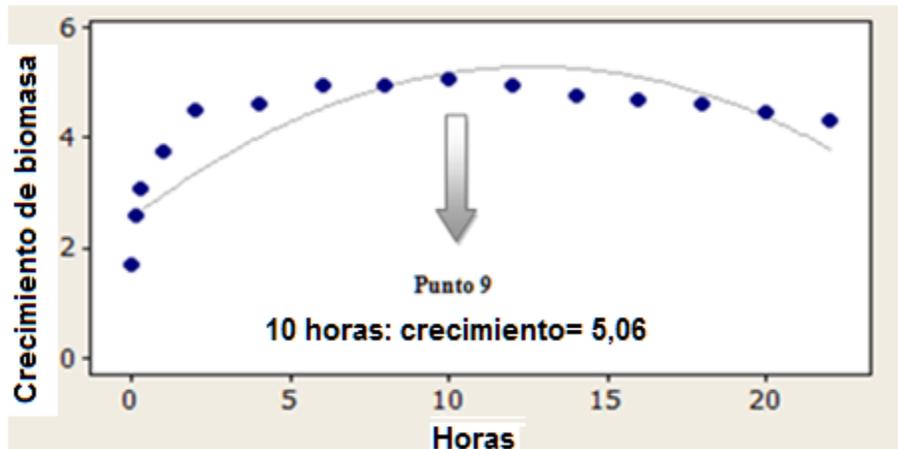
REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)
0,25	8	0,15	10	0,15	13
0,50	14	0,3	17	0,3	21
1	38	1	35	1	41
2	70	2	73	2	88
4	105	4	106	4	96
6	125	6	128	6	137
8	137	8	134	8	139
10	153	10	158	10	154
12	151	12	167	12	139
14	116	14	119	14	111
16	112	16	113	16	103
18	101	18	110	18	99
20	93	20	91	20	84
22	79	22	77	22	72
<b>TOTAL</b>	<b>1302</b>		<b>1338</b>		<b>1297</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	1302
Repetición 2	1338
Repetición 3	1297
<b>Total</b>	<b>3937</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (ac)

<b>REPETICIÓN 3</b>				
<b>PUNTOS</b>	<b>HORAS</b>	<b>RECUENTO m/o (UFL)</b>	<b>POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)</b>	<b>LOG DE POBLACIÓN</b>
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	13	5200000	2,59
3	0,50	21	8400000	3,07
4	1	41	16400000	3,74
5	2	88	35200000	4,5
6	4	96	38400000	4,59
7	6	137	54800000	4,95
8	8	139	55600000	4,96
9	10	154	61600000	5,06
10	12	139	55600000	4,96
11	14	111	44400000	4,74
12	16	103	41200000	4,66
13	18	99	39600000	4,62
14	20	84	33600000	4,46
15	22	72	28800000	4,3

**Curva de crecimiento de biomasa Vs tiempo**



**Gráfico 6.** Tratamiento (ac)

El Gráfico 6 muestra que a las 10 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (5,06), en condiciones de (150 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ , 25°C y 300 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

**Tabla 16.** Tratamiento (bc)

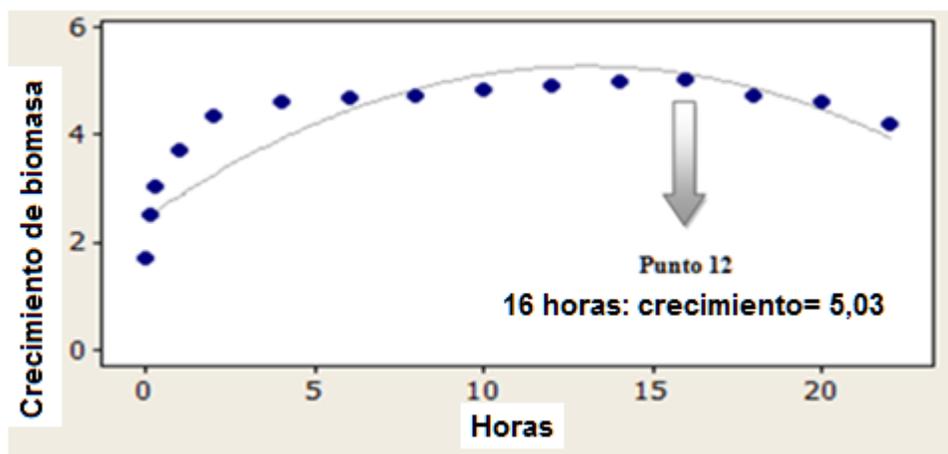
REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)
0,15	7	0,15	9	0,15	12
0,3	17	0,3	22	0,3	20
1	32	1	34	1	39
2	76	2	70	2	75
4	85	4	88	4	96
6	99	6	93	6	103
8	113	8	97	8	108
10	120	10	120	10	124
12	133	12	130	12	131
14	141	14	134	14	139
16	152	16	155	16	149
18	115	18	124	18	109
20	95	20	91	20	99
22	68	22	72	22	64
<b>TOTAL</b>	<b>1253</b>		<b>1239</b>		<b>1268</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	1253
Repetición 2	1239
Repetición 3	1268
<b>Total</b>	<b>3760</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (bc)

<b>REPETICIÓN 3</b>				
<b>PUNTOS</b>	<b>HORAS</b>	<b>RECuento m/o (UFL)</b>	<b>POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)</b>	<b>LOG DE POBLACIÓN</b>
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	12	4800000	2,51
3	0,50	20	8000000	3,02
4	1	39	15600000	3,69
5	2	75	30000000	4,34
6	4	96	38400000	4,59
7	6	103	41200000	4,66
8	8	108	43200000	4,71
9	10	124	49600000	4,81
10	12	131	52400000	4,9
11	14	139	55600000	4,96
12	16	149	59600000	5,03
13	18	109	43600000	4,72
14	20	99	39600000	4,62
15	22	64	25600000	4,19

**Curva de crecimiento de biomasa Vs tiempo**



**Gráfico 7. Tratamiento (bc)**

El Gráfico 7 muestra que a las 16 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (5,03), en condiciones de (100 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ , 30°C y 300 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

**Tabla 17.** Tratamiento (abc)

REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)	HORAS	RECuento m/o (UFL)
0,15	5	0,15	7	0,15	10
0,3	58	0,3	61	0,3	62
1	80	1	76	1	89
2	109	2	106	2	104
4	120	4	125	4	129
6	122	6	130	6	130
8	127	8	130	8	129
10	132	10	135	10	131
12	95	12	106	12	107
14	94	14	91	14	96
16	91	16	95	16	94
18	86	18	85	18	83
20	77	20	74	20	71
22	34	22	36	22	31
<b>TOTAL</b>	<b>1230</b>		<b>1257</b>		<b>1266</b>

<b>SUMATORIA DE REPETICIONES</b>	
Repetición 1	1230
Repetición 2	1257
Repetición 3	1266
<b>Total</b>	<b>3753</b>

## MEJOR REPETICIÓN TRATAMIENTO (abc)

<b>REPETICIÓN 3</b>				
PUNTOS	HORAS	RECuento m/o (UFL)	POBLACIÓN (millones de levaduras/ml)	LOG DE POBLACIÓN
1	0	7	2800000	1,97
2	0,25	10	4000000	2,33
3	0,50	62	24800000	4,15
4	1	89	35600000	4,52
5	2	104	41600000	4,67
6	4	129	51600000	4,89
7	6	130	52000000	4,89
8	8	129	51600000	4,89
9	10	131	52400000	4,9
10	12	107	42800000	4,7
11	14	96	38400000	4,56
12	16	94	37600000	4,57
13	18	83	33200000	4,73
14	20	71	28400000	4,29
15	22	31	12400000	3,46

**Curva de crecimiento de biomasa Vs tiempo**



**Gráfico 8. Tratamiento (abc)**

El Gráfico 8 muestra que a las 10 horas de estar en el proceso de fermentación, alcanzo su punto óptimo de crecimiento de biomasa (4,90), en condiciones de (150 ml  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ ,  $35^\circ\text{C}$  y 300 rpm), ya que la fuente de nitrógeno fue consumida en su totalidad.

### 4.3 DATOS DEL CRECIMIENTO DE LEVADURAS

Tabla 18. Datos del crecimiento de levaduras

Corrida	Aleatorización	Factores			Variable respuesta			$\Sigma$ Trat	Media
		A (ml)	B (°C)	C (rpm)	I	II	III		
		SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	temperatura	agitación					
1	ac	100	25	200	1302	1338	1297	3937	1312,33
2	bc	150	25	200	1253	1239	1268	3760	1253,33
3	abc	100	30	200	1230	1257	1268	3755	1251,66
4	b	150	30	200	1442	1530	1507	4479	1493
5	(1)	100	25	300	680	498	446	1624	541,33
6	c	150	25	300	1224	1176	1183	3583	1194,33
7	a	100	30	300	778	712	731	2221	740,33
8	ab	150	30	300	2185	2153	2153	6491	2163,66
<b>TOTAL DE TRATAMIENTOS Y MEDIA</b>								29850	9950
<b>PROMEDIO DE LA MEDIA</b>									1243,75

Para los resultados de crecimiento de levaduras en cada tratamiento, después de realizar las tres repeticiones se obtiene un total, ese valor se utiliza para hacer la respectiva matriz.

La tabla se organiza, asignando dos columnas por cada contraste. La columna de la izquierda se utiliza para copiar las respuestas en que los contrastes tienen un signo (-), la de la derecha para copiar las respuestas en que hay un signo (+). El valor que se copia en las casillas de cada fila (horizontal), es la variable respuesta, correspondiente a la respectiva combinación de tratamientos. Abajo de la tabla se agregan filas para las sumas, promedios, efectos, y otros cálculos que se desee efectuar. El divisor corresponde al número de términos que hay en cada columna.

Tabla 19. Respuestas del Experimento 2<sup>3</sup>

Corrida	Tratamiento	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
1	1	1624	1624	1624	1624	1624	1624	1624
2	a	2221	2221	2221	2221	2221	2221	2221
3	b	4479	4479	4479	4479	4479	4479	4479
4	ab	6491	6491	6491	6491	6491	6491	6491
5	c	3583	3583	3583	3583	3583	3583	3583
6	ac	3937	3937	3937	3937	3937	3937	3937
7	bc	3760	3760	3760	3760	3760	3760	3760
8	abc	3753	3753	3753	3753	3753	3753	3753
TOTAL		13446	11365	14397	14815	16055	18490	15812
		16402	18483	15451	15033	13793	11358	14036
VERIFICACIÓN		29848	29848	29848	29848	29848	29848	29848
FACTOR		-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
		1	1	1	1	1	1	1
NETO		2956	7118	1054	218	-2262	-7132	-1776
DIVISOR		12	12	12	12	12	12	12
EFECTO		246,33	593,166	87,83	18,16	-188,5	-594,3	-148
RANGO		3	2	6	7	4	1	5

### 4.3.1 EFECTOS DE LA MATRIZ (2<sup>3</sup>)

La fila de verificación debe dar la misma suma en todas las casillas, y es igual al total de la columna de la identidad. El valor neto o absoluto es la suma ponderada por el respectivo factor. El divisor es el número de sumandos con el mismo factor. El efecto es el valor neto dividido para el divisor. El rango es el orden de magnitud del efecto. El siguiente es el diagrama de efectos de estos resultados, en donde se puede notar que las interacciones, BC (temperatura, agitación), y ABC (sulfato de amonio, temperatura y rpm), no son significativas por estar con signo negativo, esto quiere decir que la variable respuesta disminuye, por otra parte los factores A (sulfato de amonio), B (temperatura), C (agitación), y la interacción AB (sulfato de amonio, agitación), son significativas ya que tienen signo positivo, lo que quiere decir que la variable respuesta aumenta.

### 4.3.2 ESTIMACIÓN DE EFECTOS PRINCIPALES

Factor A= (cantidad de sulfato de amonio), Factor B= (temperatura) y Factor C= (agitación).

Los efectos principales pueden estimarse usando las ecuaciones (3-5-31 a 3-5-3-8), para cada uno de los factores.

$$A = \frac{1}{4(3)} (a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc)$$

$$A = \frac{1}{12} (2221 + 6491 + 3937 + 3753 - 1624 - 4479 - 3583 - 3760)$$

$$A = 246,33$$

$$B = \frac{1}{4(3)} (b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac)$$

$$B = \frac{1}{12} (4479 + 6491 + 3760 + 3753 - 1624 - 2221 - 3583 - 3937)$$

$$B = 593,16$$

$$C = \frac{1}{4(3)} (c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab)$$

$$C = \frac{1}{12} (3583 + 3937 + 3760 + 3753 - 1624 - 2221 - 4479 - 6491)$$

$$C = 18,16$$

#### 4.3.2.1 Gráfica de efectos principales

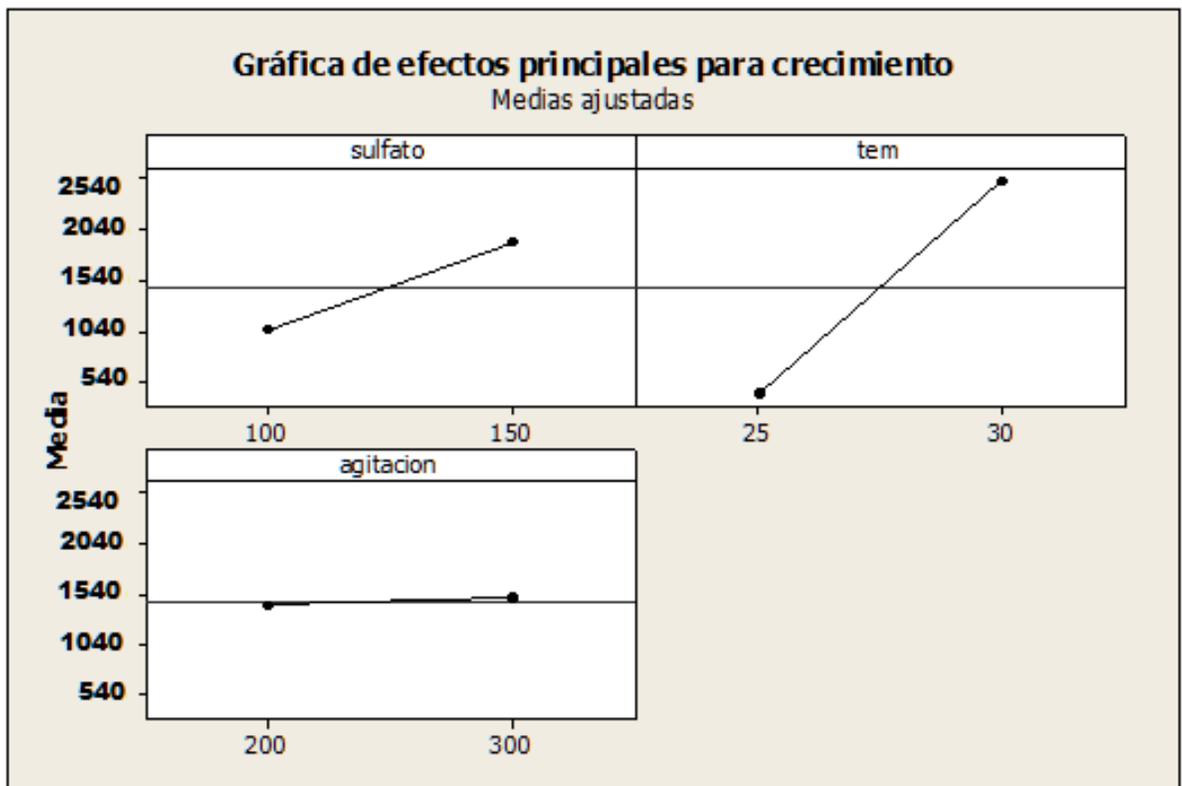


Gráfico 9. Efectos principales

Por medio de las fórmulas y el gráfico se observa que para los factores A (sulfato de amonio), B (temperatura), existe un efecto atribuible al estar con signo positivo, tener un alto rango y una buena pendiente esto indica que el valor de la variable respuesta aumenta, para el efecto del factor C (agitación), al igual que los factores A y B se encuentra con signo positivo sin embargo está con un rango muy bajo, y la pendiente que este ejerce se puede determinar a simple vista que no produce ningún efecto sobre la variable respuesta. Esto indica que la agitación no tiene tanta influencia en la producción de proteína unicelular, para lo cual se deberá realizar más pruebas con otros niveles de agitación.

### 4.3.3 ESTIMACIÓN DE EFECTOS PARA LAS INTERACCIONES

AB= (cantidad de sulfato de amonio, temperatura), AC= (cantidad de sulfato de amonio, agitación) y BC= (temperatura, agitación).

Al igual que se hizo en los efectos principales se utiliza la ecuación (3-5-3-8), para obtener los efectos que ejercen las interacciones.

$$AB = \frac{1}{4(3)} ((1) + ab + c + abc - a - b - ac - bc)$$

$$AB = \frac{1}{12} (1624 + 6491 + 3583 + 3753 - 2221 - 4479 - 3937 - 3760)$$

$$AB = 87,83$$

$$AC = \frac{1}{4(3)} ((1) + b + ac + abc - a - ab - c - bc)$$

$$AC = \frac{1}{12} (1624 + 4479 + 3937 + 3753 - 2221 - 6491 - 3583 - 3760)$$

$$AC = -188,5$$

$$BC = \frac{1}{4(3)} ((1) + a + bc + abc - b - ab - c - ac)$$

$$BC = \frac{1}{12} (1624 + 2221 + 3760 + 3753 - 4479 - 6491 - 3583 - 3937)$$

$$BC = -594,33$$

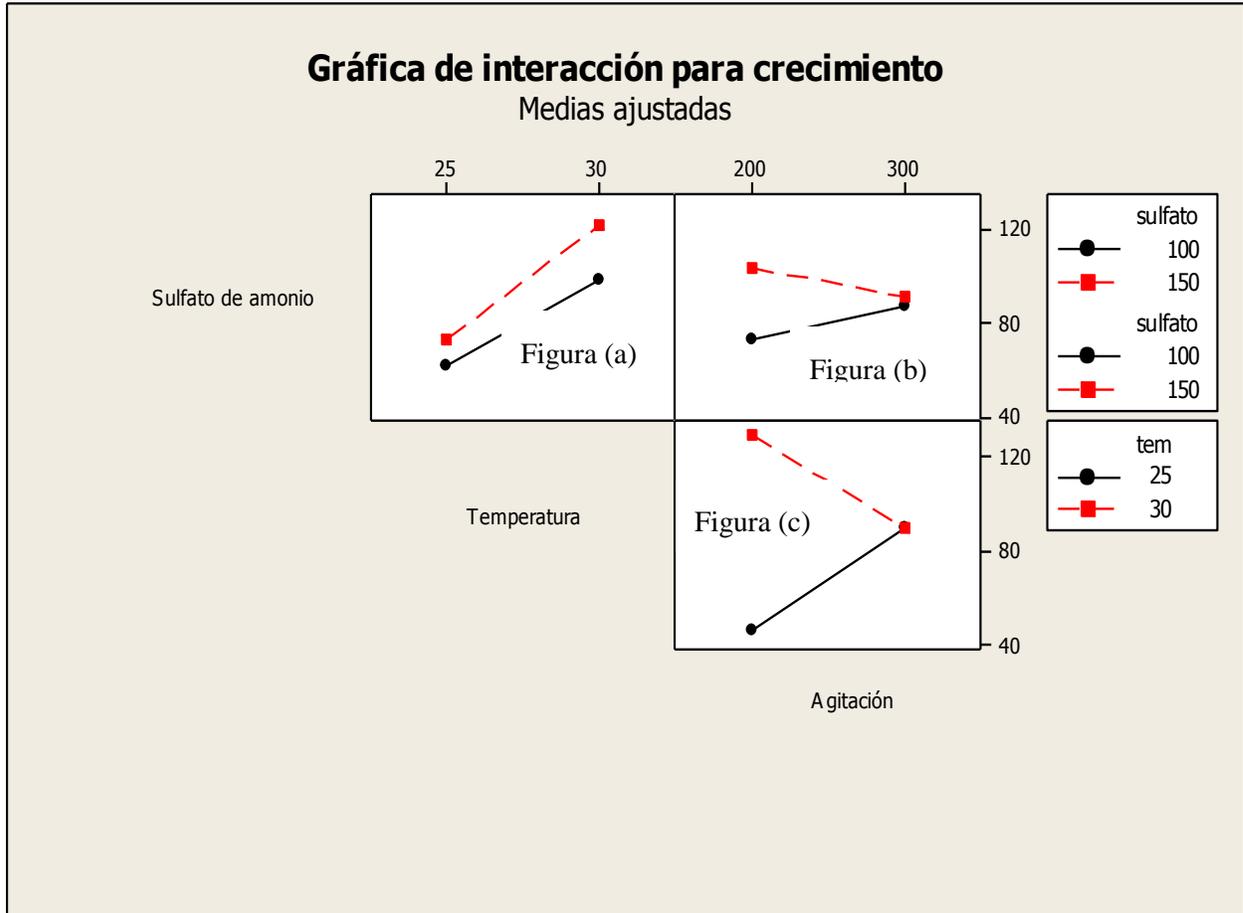
$$ABC = \frac{1}{4(3)} (a + b + c + abc - (1) - ab - ac - bc)$$

$$ABC = \frac{1}{12} (2221 + 4479 + 3583 + 3753 - 1624 - 6491 - 3937 - 3760)$$

$$ABC = -148$$

Se observa que para el caso de la interacción, AB (sulfato de amonio, temperatura), existe influencia significativa para producir proteína unicelular, ya que está con signo positivo, al contrario de las interacciones AC (sulfato de amonio, agitación), BC (temperatura, agitación) y ABC (sulfato de amonio, temperatura y agitación), no son significativas ya que encuentran con signos negativos, a pesar de que las interacciones están con un alto rango.

### 4.3.3.1 Gráfica de interacciones



**Gráfico 10.** Gráfico de interacciones

La Figura (a), del Gráfico 10, muestra la interacción AB, crecimiento microbiano Vs sulfato de amonio, estratificado por temperatura, en donde se puede observar que la variable respuesta aumenta cuando se agrega mayor cantidad de sulfato de amonio, y aumenta aún más cuando la temperatura se encuentra a 30°C.

En la Figura (b), se muestra la interacción AC, crecimiento microbiano Vs sulfato de amonio, estratificado por las rpm, en donde se puede observar que la variable respuesta incrementa solo cuando la agitación se mantiene en 200 rpm, ya que si la agitación sube a 300 rpm la variable respuesta disminuirá.

En la Figura (c), se muestra la interacción BC, crecimiento microbiano Vs temperatura, estratificado por las rpm, en donde se observa un efecto muy atribuible para la obtención de

proteína unicelular, ya que la variable respuesta aumenta significativamente cuando la temperatura pasa de (25 a 30) °C, con una agitación constante de 200 rpm.

#### 4.3.4 DIAGRAMA DE PARETO

Estos efectos principales y las interacciones pueden graficarse en un diagrama de Pareto, para así visualizar cuales son los que tienen mayor impacto sobre la variable respuesta.

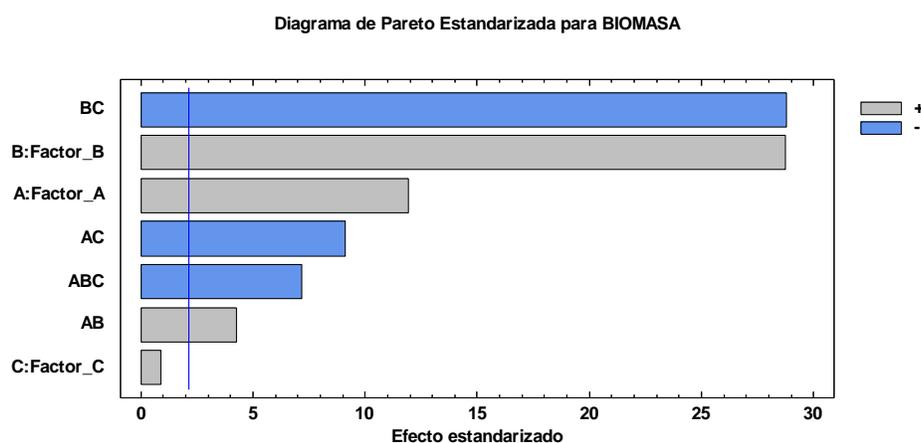


Gráfico 11. Diagrama de Pareto

Las barras de las líneas verticales son estadísticamente significativas al nivel de confianza seleccionado, situado por defecto al 5%. En este caso se puede observar que para las interacciones y los efectos principales excepto para el efecto C (agitación), todos aparentemente son significativos, no obstante se debe tomar en cuenta que los que están con signo negativo no son significativos.

#### 4.3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA

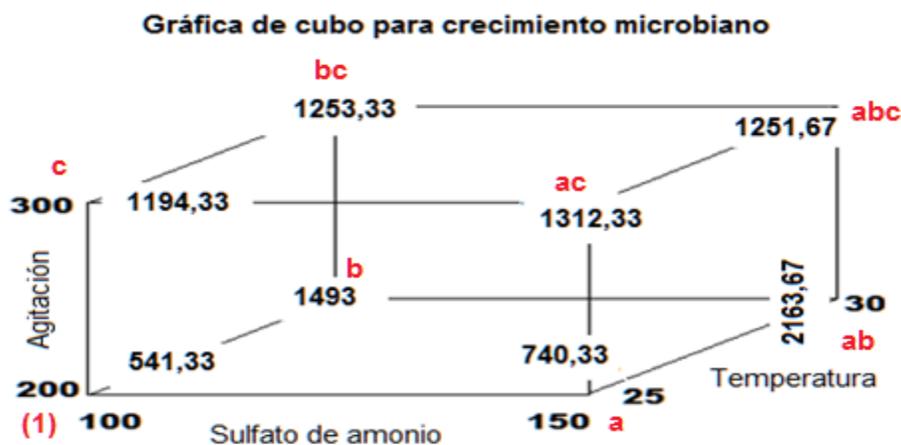
El ANOVA con todos los efectos se muestra en la Tabla 20, ahí se aprecia que los efectos que tienen un valor  $-p$  menor que 0,05, son los efectos son los efectos principales de A, B y las interacciones AB, AC, BC y ABC, que coinciden con lo visto en el diagrama de Pareto. No obstante se debe tomar muy en cuenta que las interacciones se encuentran con un signo negativo por lo que estas no son significativas a excepción de la interacción AB. Además se

puede notar que el valor  $-p$  para el efecto principal de C, sobrepasa el 0,05, por lo tanto se puede deducir que este efecto no es significativo.

**Tabla 20.** Análisis de varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Efectos	SC	GL	CM	F0	Valor- p
A: Sulfato	364080,667	1	364080,667	142,3818	0,000
B: Temperatura	2111080,17	1	2111080,17	825,584	0,000
C: Agitación	46288,166	1	46288,166	18,102	0,387
AB	1980,166	1	1980,166	0,774	0,0006
AC	213193,5	1	213193,5	83,374	0,000
BC	2119392,67	1	2119392,67	828,835	0,000
ABC	131424	1	131424	51,396	0,000
Error	40913,166	16	2557,072		
Total	5028352,5	23			

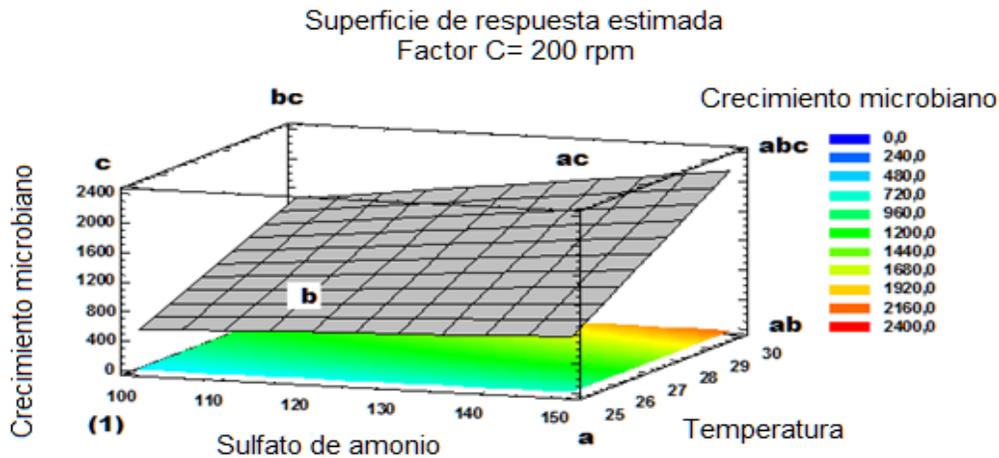
El Gráfico 12, muestra los puntos medios observados, donde muestra que el tratamiento ab es el que tiene mayor crecimiento microbiano, eso se pudo confirmar con el modelo de regresión.



**Gráfico 12.** Gráfica de puntos medios

#### 4.3.6 SUPERFICIE DE RESPUESTA

Al obtener los datos de los puntos medios y comprobando el punto de maximización de la variable respuesta con el modelo de regresión se obtiene la gráfica del análisis del experimento.

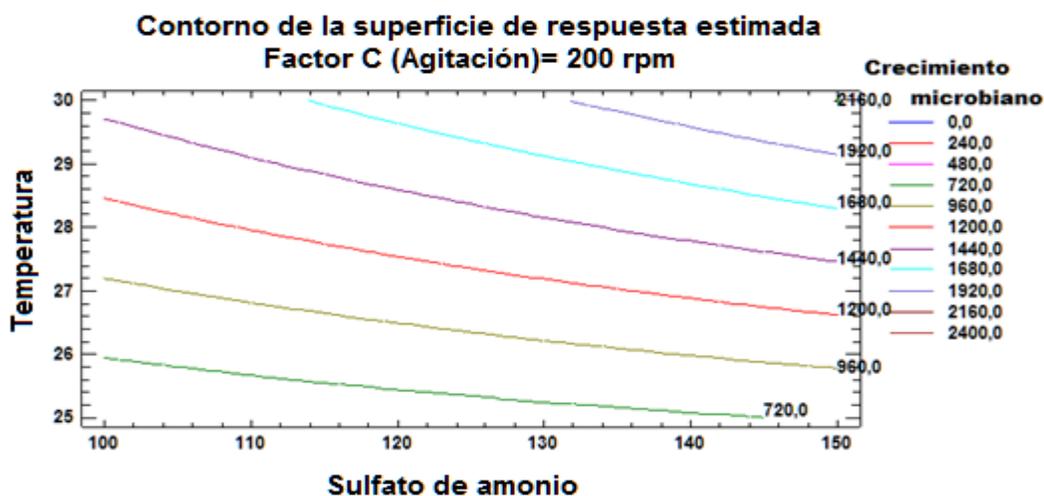


**Gráfico 13.** Superficie de respuesta

El Gráfico 13, muestra el punto óptimo para la producción de proteína unicelular en tercera dimensión, esto hace más fácil visualizar que niveles fueron los que tuvieron mayor efecto; los colores que se muestran en la base del cubo son analizados con los patrones de la parte derecha, los cuales van de un rango de (0,00 a 2400) UFL, cada uno representado por una tonalidad diferente que varía de acuerdo al crecimiento microbiano.

#### 4.3.7 GRÁFICO DE CONTORNO

El Gráfico14, ofrece un panorama general de algunos aspectos de la superficie de respuesta bidimensional que se obtiene al observar desde arriba la gráfica de respuestas tridimensional y al unir los puntos que tienen un acabado superficial. Las líneas de respuesta constante son rectas porque la superficie de respuesta es de primer orden, es decir solo incluye los efectos principales.



**Gráfico 14.** Superficie de contorno

#### 4.3.8 OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTA

**Meta:** Maximizar el crecimiento microbiano

**Valor óptimo** =2163,67 UFL (Tratamiento ab)

**Tabla 21.** Puntos óptimos para la producción de proteína unicelular.

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Sulfato de amonio	100,0	150,0	150,0
Temperatura	25,0	30,0	30,0
Velocidad	200,0	300,0	200,0

Analizado el gráfico de superficie de respuesta, observamos que el tratamiento (ab) fue el que obtuvo un mayor incremento de levaduras, por lo tanto este se considera como punto óptimo para la producción de proteína unicelular; los niveles codificados que influyeron en los diferentes factores se detallan en la Tabla 21.

#### 4.3.9 RESULTADO DE LAS VARIABLES CUANTITATIVAS

Las variables evaluadas en la presente investigación permitieron determinar las características físico-químicas.

#### 4.3.10 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE AGUA (HUMEDAD)

Por medio de los análisis físico-químicos, se puede afirmar que el tratamiento (ab), contiene menor humedad, por ende resulta ser el mejor.

<b>PORCENTAJE DE HUMEDAD</b>								
<b>Tratamientos</b>	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>Resultado(g/100g)</b>	12,74	12,6	13,47	10,19	11,52	17,7	10,56	15,6

Para determinar el porcentaje de humedad se aplica los pasos del método oficial AOAC 925.10, en la cual emplea el Método de la estufa con cápsula abierta. **ANEXO A.**

**Cálculos:**

$$\%H = \left[ \frac{m1 - m2}{m1 - m} \right] * 100$$

$$\%ST = 100\% - \%H$$

**Donde:**

**%H**= Porcentaje de Humedad

**m2**= Peso final (constante) del crisol más la muestra seca.

**m1**= Peso del crisol más la muestra fresca (húmeda).

**m**= Peso del crisol solo, tarado y desecado.

**%ST**= Porcentaje de Extracto Seco.

#### 4.3.11 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS

Por medio de los análisis físico-químicos, se puede afirmar que el tratamiento con mayor porcentaje de ceniza y que por ende resultaría ser el mejor es el tratamiento (c), seguido del tratamiento (ab).

PORCENTAJE DE CENIZA								
Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Resultado(g/100g)	7,91	8	5,2	10,8	9,63	9,5	9,1	7,6

Para determinar el porcentaje de ceniza se realiza por medio del método oficial AOAC 923.03, pero no se utilizó el aceite de oliva. **ANEXO B.**

**Cálculos:**

$$\%C = \frac{m3 - m1}{m2 - m1}$$

**%C**= Porcentaje de cenizas

**m1**= Masa del crisol vacío en gramos

**m2**= Masa del crisol con la muestra, antes de incinerar, en gramos.

**m3**= Masa del crisol con cenizas, después de incinerar, en gramos.

#### **4.3.12 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA**

Por medio de los análisis físico-químicos, se puede afirmar que el tratamiento con mayor porcentaje de proteína es el tratamiento (ab).

PORCENTAJE DE PROTEÍNA								
Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Resultado(g/100g)	19,19	20,67	25,12	42,23	40,1	25	28,82	26,5

Para determinar el porcentaje de proteína se utilizó el método Kjeldahl de la AOAC 920.87 **ANEXO C**.

**Cálculos:**

$$\%N = \frac{Vc * N_{SO4H2} * meq. gN * 100}{p}$$

**%P**= %N\*6.25

**Donde:**

**%N**= Porcentaje de Nitrógeno.

**Vc**= Volumen de ácido sulfúrico consumido en la titulación.

**NSO4H2**= Normalidad del ácido sulfúrico consumido, o sea 0,1N

**P**= Peso en gramos de la muestra utilizada.

**meq.gN**= Peso mili equivalente del Nitrógeno, o sea 0,014N

**100**= en 100gr. De muestra.

#### **4.3.12.1 Para obtener el porcentaje de proteína**

**%N**= Nitrógeno expresado en porcentaje de masa

**%P**= Porcentaje de proteína.

**6.25**= Factor de conversión del nitrógeno en proteína cruda.

## CONCLUSIONES

Al finalizar la presente investigación: **OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE LACTOSUERO**, se determinan las siguientes conclusiones:

- Del análisis de las curvas de crecimiento se determinó la cinética de la fermentación para establecer el tiempo óptimo de la fermentación, de donde se concluye que el tratamiento número tres (b), es el mejor, ya que el crecimiento microbiano se detuvo a las 8 horas, sin embargo, debido al mejor porcentaje de proteína (42,23%), se considera al tratamiento cuatro (ab), a pesar de que presentó un tiempo óptimo de fermentación de 18 horas.
- Por medio del cálculo de los efectos se puede notar que las interacciones AC (sulfato de amonio, agitación) y BC (temperatura, agitación), está en un rango alto al igual que los factores B (temperatura), A (sulfato de amonio), no obstante el efecto del factor C (agitación), está en un rango muy bajo, de lo que se concluye que no se deben considerar en forma aislada los factores sulfato de amonio y temperatura durante el proceso de fermentación si no que siempre deberán estar acompañados de una agitación continua.
- El sulfato de amonio (Factor A), que se adicionó al lactosuero influyó directamente en la obtención de proteína unicelular, de lo que se concluye que es indispensable adicionar una buena fuente de nitrógeno  $SO_4 (NH_4)_2$  al lactosuero.
- La composición nutricional del producto obtenido se determinó mediante análisis físico-químico, concluyendo que el tratamiento cuatro (ab), es el mejor ya que presenta 10,19% de humedad, en comparación a los demás tratamientos que llegaron hasta un 17,70%, lo que asegura un producto con menor riesgo de contaminación.

- Se determinó mediante el análisis físico-químico, el porcentaje de ceniza, concluyendo que el tratamiento cuatro (ab), presenta mayor porcentaje de ceniza (10,80%), lo que quiere decir que contiene mayor cantidad de minerales.
- Del balance de materiales, se concluye que para la producción de proteína unicelular a partir de lactosuero, el mejor rendimiento se obtuvo en el tratamiento (ab), ya que a partir de 2000 ml de lactosuero tratado, se obtuvo 28,2 g de biomasa, equivalente al 1,37%, con un contenido proteico de 42,23%.
- Al realizar el balance económico, se concluye que para producir 100g de proteína unicelular, a partir del lactosuero se necesitan 2,40 USD.
- En la presente investigación se acepta parcialmente la hipótesis alternativa ya que la temperatura, y la fuente de nitrógeno si influyen en el rendimiento y la calidad nutricional de la proteína unicelular, no obstante la agitación no influyó en el proceso de la misma, sin embargo es necesario mantener una agitación constante, concluyendo que el mejor tratamiento es el (ab), con una Temperatura: 30°C, 150 ml de Sulfato de Amonio y 200 rpm, con una fermentación en un tiempo óptimo de 18 horas, produciendo 28,2 g de biomasa seca con 42,23% de proteína.
- Se concluye que el lactosuero, principal subproducto de la industria láctea, puede ser utilizado en la transformación de productos útiles, como es el caso de la proteína unicelular, proporcionando un valor agregado a dichas industrias a la vez que se evita la contaminación ambiental.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer una investigación de otras fuentes de materias primas como los subproductos que se obtienen de la industria del café, banano, cacao, para producir proteína unicelular, a la vez que se puede emplear diferentes tipos de microorganismos como cepas bacterianas, y otros tipos de levaduras, como la *Kluyveromyces Marxianus*.
- Para mantener estable el pH se recomienda llevar el lactosuero inmediatamente a refrigeración para evitar variaciones con la temperatura ambiente, debido a que pH máximo para el crecimiento de las levaduras es de 4,5 ya que en pH superiores se podría producir contaminación por bacterias.
- La fuente de nitrógeno que se adiciona en el proceso de fermentación para producir proteína unicelular, es indispensable para que los microorganismos crezcan y a su vez que produzcan mayor cantidad de biomasa, de tal manera que se recomienda hacer un análisis de otras fuentes de nitrógeno para producir proteína unicelular, como es el caso del fréjol o la soya.
- Para desproteínizar el lactosuero se recomienda utilizar otro tipo de reactivos, como carrez I y II, (hexaciano ferrato de potasio II y sulfato de cinc hepta hidratado), reactivos comerciales a nivel laboratorio.
- La proteína unicelular podría emplearse en las diferentes áreas agroindustriales, como suplemento proteico en la dieta balanceada esencialmente en los animales, sin embargo se recomienda hacer investigaciones para incluir a la proteína unicelular en la dieta nutricional humana.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allermann, K., & Olsen, J. (1991). *Biotecnología Básica*. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Baltes, W. (2007). *Química de los alimentos*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Barroquio, V., Silverio, L., & Revilleza, R. (1976). Production of protein-rich animal feed supplement from cheese whey. *Rev Appl. Environ Microbiol*, 209-211.
- Bastea, L., Doppler, H., Pearce, S., Durand, N., Spratley, S., & Storz, P. (2013). Biorreactor design for solid. *Rev Biochemical journal*, 216-225.
- Bastidas, O. (2008). Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. *Celeromics*, 1-6.
- Bradger, T. (2011). Proyecto de investigación de los factores dietéticos en el ACNC. *Rev Prevención de la Obesidad Infantil*, 16-22.
- Brewer, J. (2007). *Producción y purificación de enzimas finas*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Bu'lock, J., & Kristiansen, B. (1991). *Basic Biotechnology*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Buitriago, G., Soto, L., Páez, G., Araujo, K., Mármol, Z., & Rincón, M. (2008). Continue production of single cell protein of *Klutveromyces marxianus* var. *marxianus* from diluted cheese whey. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 31-40.
- Carrillo, M., Aguilar, M., Wong, E., & Muñiz, D. (2010). Producción de biomasa. *Rev U. Tecnociencia*, 32-40.
- Castrillo, D., Zaldivar, M., Alvarez, H., Villamil, P., & Bada, D. (1992). *Patente nº 9200513*. España.
- Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular SCP en la agricultura y la industria. *Rev Agronomía mesoamericana*, 93-106.
- Chiancone, E. y. (1992). *Patente nº 88830115.7*. España.
- Correa, A. (2005). Órdenes de experimentación en diseños factoriales. *Universitat Politècnica de Catalunya*, 3-7.

- Coultate, T. (2007). *Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos*. Zaragoza: ACRIBIA,S.A.
- Cribb, P. (2004). Aplicación a la nutrición en los deportes. *Rev U.S Dairy Export Council*, 1-12.
- Demien, A. (2010). *La biomasa:Fundamentos;Tecnologías y Aplicaciones*. Tarragona: AMV ediciones.
- Duran, B. (1986). Producción de proteína unicelular de desechos (PUCD) a partir de efluentes de la industrialización del maíz para consumo humano. *Rev Tecnol. Aliment*, 19-26.
- Fontecha, J., Recio, I., & Pilosof, A. (2009). *Valorización de subproductos lacteos de interés industrial y para el diseño de alimentos para grupos vulnerables*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Garrido, G., & Tuninetti, L. (2013). Estudio ambiental sobre el aprovechamiento del suero. *Rev Noticiero Tecnológico Región Centro INTI*, 1-3.
- González, R. (2010). *Diseño de un proceso continuo para la obtención de lactoproteínas a partir del suero dulce de quesería utilizando bioreactores*. México: El Cid.
- Graciano, G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 339–354.
- Gutierrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño experimental*. España: Mc Graw Hill.
- Huerta, L. (2006). Revisión: Síntesis Enzimática de Galacto-oligosacáridos a partir de residuos de la industria láctea. *Rev Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile*, 1-14.
- INAMHI. (2014). Estación metereológica del Ecuador.
- Linden, G., & Lorient, D. (2006). *Propiedades del suero de la leche*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Merchuck, J. (1993). *Microbiología Industrial*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Miranda, O., Ponce, I., Fonseca, P. L., Cutiño, M., Díaz, R. M., & Cedeño, C. (2009). Características físico-químicas de sueros en quesos. *Rev Cub Aliment Nutr*, 21-25.

- Montgomery, D. (2013). *Control estadístico de la calidad*. México: Limusa Wiley.
- Otero, M., Saura, G., Wagner, J., & Guerrero, I. (2009). Propagación discontinua de la levadura *Kluyveromyces* sp a partir de suero de queso. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 4.
- Palmerín, D. M., Guevara, L., Villaseñor, F., & Pérez, C. (2011). Identificación de una levadura para producción de proteína unicelular. *Rev Ingeniería Bioquímica CIENCIA@UAQ*, 35-37.
- Parra, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 4967-4982.
- Quintero, H., Rodriguez, M., Paez, G., Ferrer, J., Marmol, Z., & Rincón, M. (2001). Producción continua de proteína microbiana (*K. Fragilis*). *Revista científica CFC-LUZ*, 88-89.
- Ruiz, H., Rodriguez, H., Contreras, J., & Aguilar, C. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de ingeniería química*, 34-35.
- Tribaldo, F., & Josep, M. (1988). *Lactosuero: problemática, situación actual y tendencias*. México: El manual moderno.
- Vazquez, D., Orazco, C., Ordaz, L., & Garcia, S. (2007). *Laboratorio de Biorreactores Manual de prácticas*.
- Yáñez, D., & Montalvo, M. A. (2013). Alimentación con suero de quesería mas balanceado en fases de crecimiento y finalización para mejorar los parametros productivos en cerdos. *Universidad Central del Ecuador*, 19.
- Zhadow, L. (2003). *Concentrados de proteínas del suero de leche*. Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Zumbado, W., Esquivel, P., & Wong, E. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 151-160.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A**

### **DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE AGUA (HUMEDAD)**

27.3.06

**AOAC Official Method 935.29**  
**Moisture in Malt**  
Gravimetric Method  
Final Action

**A. Apparatus**

(a) *Weighing dish*.—Use glass bottle or Al dish, with tight-fitting cover, ca 40 mm diameter for 5 g sample, or 55 mm for 10 g sample.

(b) *Oven*.—With automatic control holding temperature within  $\pm 0.5^\circ$ , and large enough to hold all samples on 1 shelf in such manner that no sample is outside area indicated by test to give comparable results in duplicate samples. Standardize oven as follows: Place weighed duplicate samples in oven at  $103\text{--}104^\circ$  and dry 3 h. Weigh, and redry 1 h longer. If loss of moisture is 0.1%, raise temperature  $1^\circ$  and again test with new duplicate samples. Take, as standard, lowest temperature  $<106^\circ$  giving moisture content that, after 3 h of drying, is within 0.1% of value attainable at same temperature within 4 h. Keep ventilators of oven open during entire drying period, and do not open door during the 3 h of drying.

**B. Preparation of Sample**

(a) *If extract determination is to be made*.—Grind sample as in **982.12A** (see 27.1.45), and transfer in one continuous operation. When many samples are to be analyzed, grind first sample, remove beaker, and grind second sample while adjusting weight of first sample. Remove second sample, insert third sample, and repeat operation.

(b) *If extract determination is not to be made*.—Have sample of same fineness as finely ground malt used to determine extract. Weigh ca 5 g whole malt (or 10 g if 55 mm diameter weighing bottle is used) and grind through clean dry mill directly into weighing bottle. Brush all malt from mill into weighing bottle and cover immediately.

**C. Determination**

Weigh sample to 1 mg and place in oven previously heated to standard temperature. Remove cover of weighing bottle and heat exactly 3 h at standard temperature. Replace cover, transfer to desiccator, cool to room temperature, and weigh to 1 mg. Report moisture to nearest 0.1%.

## **ANEXO B**

### **DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS**

### 32.1.05

#### **AOAC Official Method 923.03** **Ash of Flour** **Direct Method** **Final Action**

Weigh 3–5 g well-mixed sample into shallow, relatively broad ashing dish that has been ignited, cooled in desiccator, and weighed soon after reaching room temperature. Ignite in furnace at ca 550° (dull red) until light gray ash results, or to constant weight. Cool in desiccator and weigh soon after reaching room temperature. Reignited CaO is satisfactory drying agent for desiccator.

Reference: JAOAC 7, 132(1923).

**ANEXO C**  
**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA**

### 32.1.22

#### AOAC Official Method 920.87 Protein (Total)

Final Action

Codex-Adopted—AOAC Method\*

(*Caution: See Appendix B, safety notes on handling acids and alkalis.*)

Place weighed sample (0.7–2.2 g) in digestion flask. Add 0.7 g HgO or 0.65 g metallic Hg, 15 g powdered K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. If sample >2.2 g is used, increase H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> by 10 mL for each g sample. Place flask in inclined position and heat gently until frothing ceases (if necessary, add small amount of paraffin to reduce frothing); boil briskly until solution clears and then 30 min longer (2 h for samples containing organic material).

Cool, add ca 200 mL H<sub>2</sub>O, cool <25°, add 25 mL of the sulfide or thiosulfate solution, and mix to precipitate Hg. Add few Zn granules to prevent bumping, tilt flask, and add layer of NaOH without agitation. (For each 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> used, or its equivalent in diluted H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, add 15 g solid NaOH or enough solution to make contents strongly alkaline.) (Thiosulfate or sulfide solution may be mixed with the NaOH solution before addition to flask.) Immediately connect flask to distilling bulb on condenser, and, with tip of condenser immersed in standard acid and 5–7 drops indicator in receiver, rotate flask to mix contents thoroughly; then heat until all NH<sub>3</sub> had distilled (150 mL distillate). Remove receiver, wash tip of condenser, and titrate excess standard acid in distillate with standard NaOH solution. Correct for blank determination on reagents.

$$\% \text{ N} = \frac{[(\text{mL standard acid normality acid}) - (\text{mL standard NaOH normality NaOH})] \times 1.4007}{\text{g sample}}$$

Multiply % N by 5.7 to obtain % protein.

#### Microchemical Determination of Nitrogen

Micro-Kjeldahl Method

First Action 1960

Final Action 1961

AOAC–AACC Method

See **960.52** (see 12.1.07).

#### Protein (Crude) in Animal Feed

Copper Catalyst Kjeldahl Method

First Action 1984

AOAC–AACC Method

See **984.13** (see 4.2.09).

\*Adopted as a Codex Defining Method (Type I) for Kjeldahl digestion of protein in whole and decorticated pearl millet grains (African regional standard) and pearl millet flour (African regional standard).

**ANEXO D**

**PRUEBAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS FÍSICO-  
QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN 002-CONEA-2010-129-DC.  
Resolución No. 001-073-CEAACES-2013-13

## Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos

Informe N°: 055 - 2014

Ibarra, 11 de abril de 2014

Análisis solicitado por:

Sres: Ronnie Mora y Cristian Bravo

Número de muestras :

Uno, Suero de leche

Fecha de recepción de las  
muestras:

24 de marzo de 2014

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado	Método de ensayo
Proteína	g/100 g	20,12	AOAC 920.87

*Los resultados obtenidos pertenecen exclusivamente para las muestras analizadas*

Atentamente:

  
Bioq. José Luis Moreno  
Técnico de Laboratorio



### Visión Institucional

La Universidad Técnica del Norte en el año 2020, será un referente en ciencia, tecnología e innovación en el país, con estándares de excelencia institucionales.

Av. 17 de Julio S-21 y José María  
Córdova. Barrio El Olivo.  
Teléfono: (06)2997800  
Fax: Ext: 7711  
Email: utn@utn.edu.ec



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN 002-CONEA-2010-129-DC.  
Resolución No. 001-073-CEAACES-2013-13

## Laboratorio de Análisis Físicos, Químicos y Microbiológicos

Informe N°: 054 - 2014

Ibarra, 11 de abril de 2014

Análisis solicitado por: Sres: Ronnie Mora y Cristian Bravo

Número de muestras : Ocho, Proteína Unicelular

Fecha de recepción de las muestras: 24 de marzo de 2014

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado				Método de ensayo
		T1	T2	T3	T4	
Humedad	g/100 g	12,74	12,6	13,47	10,19	AOAC 925.10
Proteína	g/100 g	19,19	20,67	25,12	42,23	AOAC 920.87
Cenizas	g/100 g	7,91	8,00	5,20	10,80	AOAC 923.03

Parámetro Analizado	Unidad	Resultado				Método de ensayo
		T5	T6	T7	T8	
Humedad	g/100 g	11,520	17,700	10,560	15,600	AOAC 925.10
Proteína	g/100 g	40,10	25,00	28,82	26,50	AOAC 920.87
Cenizas	g/100 g	9,63	9,50	9,10	7,60	AOAC 923.03

Los resultados obtenidos pertenecen exclusivamente para las muestras analizadas

Atentamente:

Bíoq. José Luis Moreno  
Técnico de Laboratorio



### Visión Institucional

La Universidad Técnica del Norte en el año 2020, será un referente en ciencia, tecnología e innovación en el país, con estándares de excelencia institucionales

Av. 17 de Julio 9-21 y José María  
Córdova. Barrio El Olivo  
Teléfono: (06)2997800  
Fax: Ext. 7711.  
Email: utn@utn.edu.ec

## **ANEXO E**

### **FICHA TÉCNICA SULFATO DE AMÓNIO**

## SULFATO DE AMONIO ESTÁNDAR

El Sulfato de Amonio (SAM) es una sal con fórmula química  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  que se obtiene comercialmente a partir de la reacción del amoniaco y Ácido Sulfúrico. El Sulfato de Amonio es insoluble en alcohol y es un compuesto ligeramente higroscópico que absorbe el agua del aire cuando la humedad relativa es mayor del 81%.

Su uso principal es fertilizante artificial para suelos alcalinos, ya que al separarse el ion Sulfato en el suelo, forma Ácido Sulfúrico bajando el pH, mientras que contribuye con el Nitrógeno al crecimiento de las plantas.

Entre otras de sus aplicaciones están: Coadyudante agrícola para la aplicación de insecticidas, herbicidas y fungicidas; en la síntesis de otras sales de Amonio y en Bioquímica, la precipitación del sulfato de Amonio es un método común para purificar proteínas solubles. También se utiliza como floculante.

### ANÁLISIS QUÍMICO Y DATOS FÍSICOS:

➤ Nitrógeno Total (N), %	21.0
➤ Azufre Total (S), %	24.0
➤ Acidez (Solución 5%)	0.1
➤ Humedad, %	1.0 Maximo
➤ Malla Tyler +28 (0.6 mm), % Acumulativo	4 Tipico
➤ Malla Tyler +35 (0.42 mm), % Acumulativo	45 Tipico
➤ Malla Tyler +48 (0.30 mm), % Acumulativo	95 Tipico
➤ Malla Tyler +65 (0.21 mm), % Acumulativo	100 Tipico

### PRESENTACIÓN:

El Sulfato de Amonio se envasa en sacos de polipropileno de 50 Kilos c/u, en tarimas de madera con 20 sacos c/u recubierta con bolsa de plástico termoencogible calibre 600 y 4 flejes de 1/2".

## **ANEXO F**

### **FICHA TÉCNICA ÁCIDO TRICLORO ACÉTICO**



FAGRON IBERICA, S.A.U.  
Teléfono: 93 731 07 22  
Fax: 93 731 10 44

consultas@fagron.es  
www.fagron.es

## FICHA TÉCNICA

# ÁCIDO TRICLOROACÉTICO

<b>Número CAS</b>	76-03-9						
<b>Sinonimias</b>	Acidum trichloroaceticum. Ácido tricloroetanoico. TCA.						
<b>Características</b>	<table><tr><td>ASPECTO</td><td>Masa cristalina blanca o cristales incoloros, muy deliquescente.</td></tr><tr><td>PESO MOLECULAR</td><td>163,40</td></tr><tr><td>FÓRMULA MOLECULAR</td><td><math>C_2HCl_3O_2</math></td></tr></table>	ASPECTO	Masa cristalina blanca o cristales incoloros, muy deliquescente.	PESO MOLECULAR	163,40	FÓRMULA MOLECULAR	$C_2HCl_3O_2$
ASPECTO	Masa cristalina blanca o cristales incoloros, muy deliquescente.						
PESO MOLECULAR	163,40						
FÓRMULA MOLECULAR	$C_2HCl_3O_2$						
<b>Solubilidad</b>	Muy soluble en agua, alcohol y cloruro de metileno.						
<b>Aplicaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Se emplea como escarótico para la eliminación de verrugas en solución concentrada, que se prepara agregando al producto un 10 - 30 % de agua. Los tejidos que rodean a la verruga se protegen con vaselina filante o colodión; no se produce inflamación tisular pero se origina una escara blanca que se desprende en un plazo de 2 - 3 días.</li><li>• También se ha usado en la eliminación de tatuajes.</li><li>• Para realizar peelings en la piel acneica y gruesa, se utilizan concentraciones del 20 - 50%, aplicándolo mediante torunda de algodón fijada a una varilla y quitándolo con agua tan pronto como empiece a blanquear. El tratamiento debe efectuarse en clínicas especializadas.</li><li>• En casos de hiperhidrosis plantar se emplea como astringente, en forma de disolución acuosa al 0,1 - 1 %.</li></ul>						
<b>Toxicidad y efectos secundarios</b>	El ácido tricloroacético es muy irritante y corrosivo, ocasionando tras su ingestión accidental dolor intenso, vómitos violentos y hematemesis. En la boca aparecen fragmentos de tejidos y un moco blanco viscoso o manchado de sangre, que después amarillea o se vuelve marrón. Los vómitos contienen sangre alterada, fragmentos de mucosa y restos de comida, a menudo con un aspecto característico de granos de café.						

<b>Formulación</b>	<b>Ácido tricloroacético líquido</b>		
	Ácido tricloroacético	45	g
	Agua purificada	5	g
	<b>Vinagre cáustico</b>		
	Ácido tricloroacético	25	g
	Agua purificada	25	g
<b>Formulación</b>	<b>Solución alcohólica de ácido tricloroacético</b>		
	Ácido tricloroacético	35	g
	Alcohol 96º	25	ml
<b>Precauciones</b>	Debe utilizarse con precaución ya que es muy corrosivo para la piel.		
<b>Conservación</b>	En envase hermético.		
<b>Bibliografía</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monografías Farmacéuticas. COF Alicante, 1998.</li> <li>• P. Umbert, F. Llambí. La formulación en la dermatología del 2010. 2008.</li> </ul>		

**ANEXO G**  
**FOTOGRAFÍAS**

## PARTES DEL BIORREACTOR



pH metro



Rotor



Recirculador de agua



Frasco de fermentación capacidad de 5 litros

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS E INSUMOS



Pesado de Ácido tri cloro acético  $C_2HCl_3O_2$



Pesado de Sulfato de Amonio  $SO_4(NH_4)_2$



Pesado del inoculo (*Saccharomyces cerevisiae*)



Preparación del  $C_2HCl_3O_2$



Preparación de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

## DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DEL LACTOSUERO

### RECEPCIÓN DE MATERIA PRIMA



Lactosuero con pH 4,3

### DESPROTEINIZACIÓN Y CLARIFICACIÓN DEL LACTO SUERO



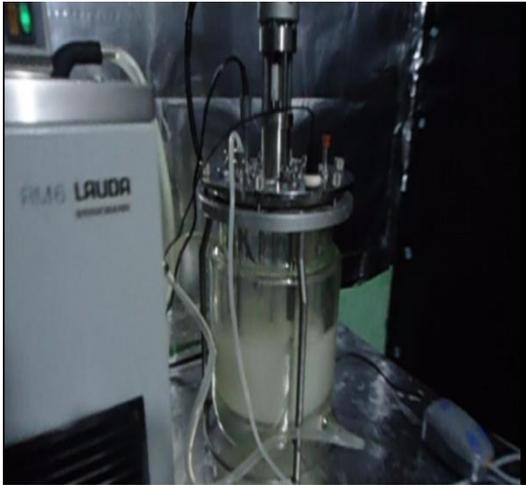
Lactosuero Desproteinizado con pH de 3,7

## FILTRACIÓN

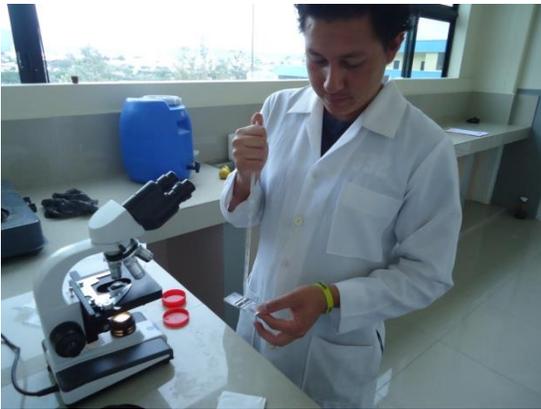


## FERMENTACIÓN

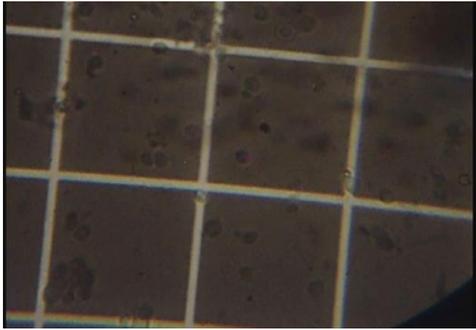




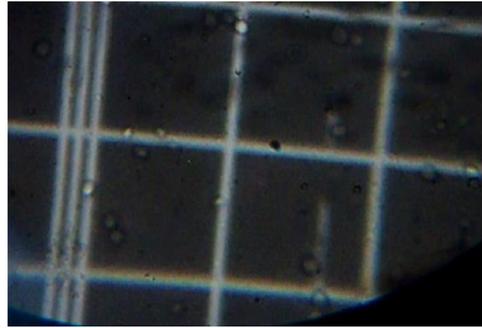
## RECuento TOTAL DE LEVADURAS



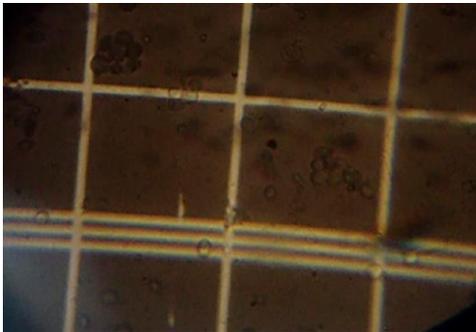
## LEVADURAS VISTAS AL MICROSCOPIO



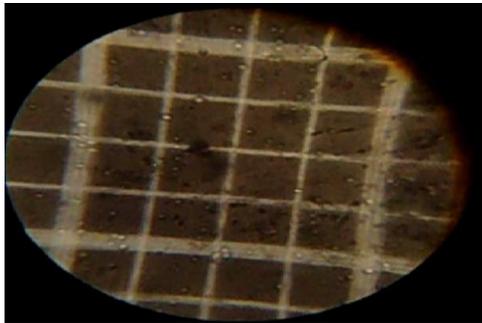
TRATAMIENTO 1



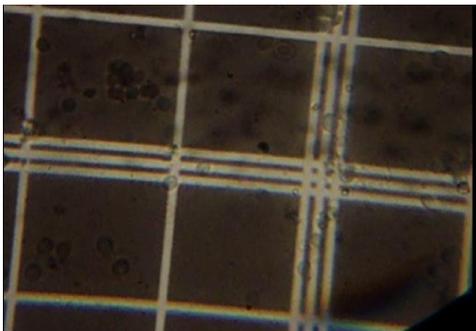
TRATAMIENTO a



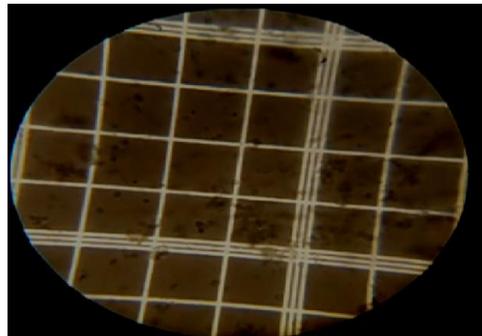
TRATAMIENTO b



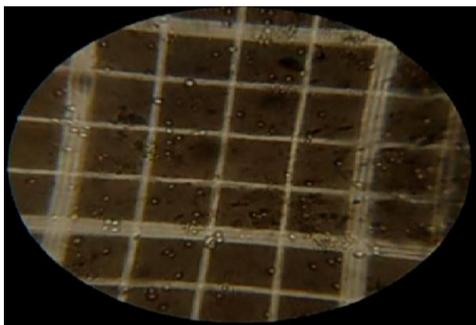
TRATAMIENTO ab



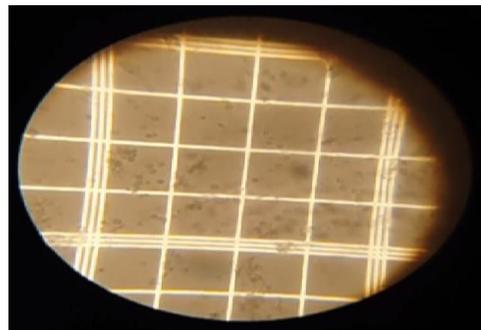
TRATAMIENTO c



TRATAMIENTO ac



TRATAMIENTO bc



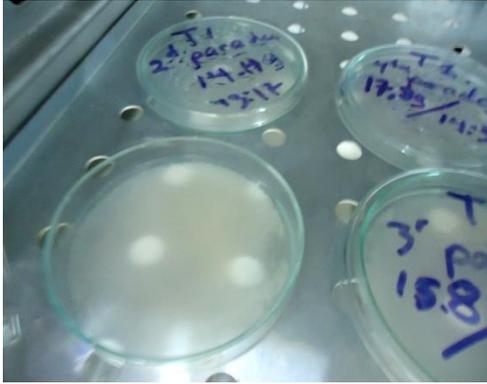
TRATAMIENTO abc

## CENTRIFUGACIÓN



## SEPARACIÓN Y SECADO





## RECOLECCIÓN DEL PRODUCTO



**ANEXO H**  
**ARTÍCULO CIENTÍFICO**