



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

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

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**“OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR EL MÉTODO DE  
CÉLULAS INMOVILIZADAS DEL *Lactobacillus casei*”**

**Trabajo de titulación previo para la obtención del título de Ingeniera  
Agroindustrial**

**Autor: Cinthia Macarena Novoa Arroyo**

**Director: Ing. Jimmy Núñez Pérez, MSc.**

**Ibarra - Ecuador**

**2019**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

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

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**“OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR EL MÉTODO DE CÉLULAS  
INMOVILIZADAS DEL *Lactobacillus casei*”**

Tesis revisada por miembros del tribunal, por lo cual se autoriza su presentación  
como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**APROBADA:**

Ing. Jimmy Núñez, MSc

**DIRECTOR DE TESIS**

Ing. José Manuel Pais Chanfrau, PhD

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Marco Lara, MSc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Lic. Ima Sánchez, MSc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**FIRMA**

.....

.....

.....

.....



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

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO		
CÉDULA DE IDENTIDAD:	172443346-9	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Novoa Arroyo Cinthia Macarena	
DIRECCIÓN:	Cayambe	
EMAIL:	girlsc94m@hotmail.com	
TELÉFONO FIJO:	TELÉFONO MÓVIL:	0992457809

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	"OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR EL MÉTODO DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DEL <i>Lactobacillus casei</i> "
AUTOR (ES):	Novoa Arroyo Cinthia Macarena
FECHA: DD/MM/AAAA	17/09/2019
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera Agroindustrial
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Jimmy Nuñez, MSc

**2. CONSTANCIAS**

El autor manifiesta 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 el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 17 días del mes de septiembre de 2019

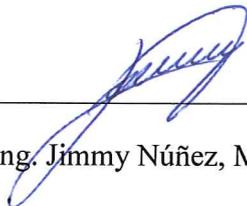
**EL AUTOR:**

(Firma).....

**Nombre:** Novoa Arroyo Cinthia Macarena

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Cinthia Macarena Novoa Arroyo, con cédula de ciudadanía N° 172443346-9 bajo mi supervisión.



---

Ing. Jimmy Núñez, MSc

**DIRECTOR DE TESIS**

## DECLARACIÓN

Manifiesto que la presente obra es original y se desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, es original y que soy el titular de los derechos patrimoniales; por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldré en defensa de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación de terceros.

Ibarra, a los 17 días del mes de septiembre del 2019

**Autor**



---

Cinthia Macarena Novoa Arroyo

C.C. 172443346-9

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida y ser mi fortaleza diaria.*

*A mis padres y hermana que siempre han sido mi apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida y son el eje fundamental de mi existir.*

*A mi director Ing. Jimmy Núñez por su guía, sus enseñanzas y su paciencia durante todo este trabajo de investigación, a mis asesores por su apoyo y dedicación.*

**Cinthia Novoa**

## **DEDICATORIA**

*Este logro se lo dedico a DIOS, que ha sido un padre muy bueno; que ha estado junto a mí en cada paso de mi vida y me enseñó el amor más bonito, puro, especial e incondicional de un padre amoroso.*

**Cinthia Novoa**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS .....	xiv
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO I.....	17
INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. ANTECEDENTES .....	17
1.2. PROBLEMA .....	19
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	20
1.4. OBJETIVOS.....	21
1.4.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
1.5. HIPÓTESIS .....	21
1.5.1. HIPÓTESIS NULA.....	21
1.5.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA .....	21
CAPÍTULO II .....	22
MARCO TEÓRICO.....	22
2.1. INDUSTRIA LÁCTEA.....	22
2.2. LACTOSUERO.....	22
2.2.1. COMPOSICIÓN Y TIPOS DE LACTOSUERO .....	23
2.2.2. CONTAMINACIÓN QUE CAUSA AL MEDIO AMBIENTE.....	25
2.3. QUESO CAMEMBERT .....	26

2.4.	BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	27
2.4.1.	<i>Lactobacillus casei</i> .....	29
2.5.	SISTEMAS DE FERMENTACIÓN.....	31
2.5.1.	PROCESOS CONTINUOS Y DISCONTINUOS.....	31
2.5.1.1.	Biorreactor Continuo de Flujo Pistón (BCFP).....	32
2.6.	ÁCIDO LÁCTICO.....	32
2.6.1.	CARACTERÍSTICAS Y CONCENTRACIONES DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	34
2.6.2.	USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	35
2.6.2.1.	Industria alimenticia.....	35
2.6.2.2.	Confitería.....	36
2.6.2.3.	Bebidas.....	36
2.6.2.4.	Envasado de conservas.....	36
2.6.2.5.	Productos cárnicos.....	36
2.6.2.6.	Industria panadera.....	37
2.6.2.7.	Industria farmacéutica.....	37
2.6.2.8.	Industria cosmética.....	37
2.6.3.	FACTORES DE ESTUDIO EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	37
2.6.3.1.	Efecto de la temperatura.....	37
2.7.	INMOVILIZACIÓN CELULAR.....	39
2.7.1.	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN MÁS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	39
2.7.1.1.	Atrapamiento en alginato de calcio.....	39
2.7.1.2.	La inmovilización de células en carragenina y agar.....	39

2.7.1.3. Inmovilización de células en poliacrilamida.....	40
2.7. PRODUCTIVIDAD .....	40
2.8. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	41
CAPÍTULO III.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	42
3.1.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	42
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS .....	43
3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS .....	43
3.2.2. EQUIPOS.....	43
3.2.3. MATERIALES .....	43
3.3. METODOLOGÍA .....	44
3.3.1. CONDICIONES DE LA MATERIA PRIMA.....	44
3.3.1.1. Caracterización del suero.....	44
3.3.2. DETERMINAR PARÁMETROS DE PROCESO DE FLUJO DE ALIMENTACIÓN Y TEMPERATURA PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DEL <i>Lactobacillus casei</i> .....	46
3.3.2.1. Factores a estudiar.....	46
3.3.2.2. Tratamientos de estudio .....	47
3.3.2.3. Características de la unidad experimental.....	49
3.3.2. REALIZAR UN ESTUDIO CINÉTICO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO .....	49
3.3.3. CARACTERIZAR EL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO EN EL PROCESO .....	49
3.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO .....	50

CAPÍTULO IV.....	56
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	56
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL SUERO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	56
4.2. DETERMINAR PARÁMETROS DEL PROCESO: FLUJO DE ALIMENTACIÓN Y TEMPERATURA PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DEL <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> 57	57
4.2.1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN.....	59
4.2.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL NUEVO DISEÑO EXPERIMENTAL.....	61
4.2.3. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA NUEVA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE PRODUCTIVIDAD TOTAL DE ÁCIDO LÁCTICO.....	62
4.2.4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO SUGERIDO PARA LA MAXIMIZACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE ÁCIDO LÁCTICO.....	64
4.2.5. REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE PRODUCTIVIDAD DE ÁCIDO LÁCTICO.....	66
4.3. REALIZAR UN ESTUDIO CINÉTICO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	69
4.4. CARACTERIZAR EL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO EN EL PROCESO.....	72
CAPÍTULO V.....	73
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73

5.1. CONCLUSIONES.....	73
5.2. RECOMENDACIONES .....	73
6. BIBLIOGRAFÍA .....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición general del suero fresco. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Requisitos físico- químicos del suero de leche líquido.....	25
<b>Tabla 3.</b> Bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativa y su configuración	28
<b>Tabla 4.</b> Composición de medio de cultivo MRS .....	30
<b>Tabla 5.</b> Características del ácido láctico (E270) 80%.....	34
<b>Tabla 6.</b> Características del Ácido láctico 90% apto para uso farmacéutico. ....	35
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones comerciales de ácido láctico.....	35
<b>Tabla 8.</b> Datos Climatográficos.....	42
<b>Tabla 9.</b> Análisis físico- químicos para el lactosuero dulce.....	44
<b>Tabla 10.</b> Factor A: Temperatura .....	47
<b>Tabla 11.</b> Factor B: Flujo de alimentación.....	47
<b>Tabla 12.</b> Descripción de tratamientos a evaluarse. ....	48
<b>Tabla 13.</b> Análisis físico- químicos para el ácido láctico.....	50
<b>Tabla 14.</b> Características físico- químicos del lactosuero de leche.....	56
<b>Tabla 15.</b> ANOVA para el modelo de primer orden de la productividad total de ácido láctico (g/h) para la optimización de las condiciones de fermentación.....	59
<b>Tabla 16.</b> Condición óptima predicha y real para la maximización de la productividad de ácido láctico .....	61
<b>Tabla 17.</b> Resultados de productividad total de ácido láctico .....	63
<b>Tabla 18.</b> ANOVA para el modelo de primer orden de la productividad de ácido láctico. ....	64
<b>Tabla 19.</b> Condiciones óptimas para la maximización de productividad total de ácido láctico según el modelo sugerido. ....	65
<b>Tabla 20.</b> Condición óptima predicha y real para la maximización de la productividad de ácido láctico. ....	66

<b>Tabla 21.</b> Resultados alcanzados de productividad total frente a productividad volumétrica según valores de las variables en estudio.....	68
<b>Tabla 22.</b> Productividad de ácido láctico a diferentes condiciones de cultivo.....	71
<b>Tabla 23.</b> Características físico-químicos del ácido láctico obtenido.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fermentación de glucosa por bacterias homo y heterofermentativas...	29
<b>Figura 2.</b> Estructura de isómeros L y D del ácido láctico .....	34
<b>Figura 3.</b> Influencia de la temperatura y utilización de lactosa en la producción de ácido láctico en fermentación discontinua. ....	38
<b>Figura 4.</b> La productividad y sus componentes.....	41
<b>Figura 5.</b> Distribución de las variables de estudio en forma gráfica.....	49
<b>Figura 6.</b> Diagrama de bloques para la obtención de ácido láctico.....	50
<b>Figura 7.</b> Diagrama para la maximización de la productividad de ácido láctico .	58
<b>Figura 8.</b> Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo. ....	60
<b>Figura 9.</b> Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo. ....	62
<b>Figura 10.</b> Valores predichos vs valores reales de productividad total.....	65
<b>Figura 11.</b> A) Plot de Contorno del punto óptimo de la maximización de la productividad total de ácido láctico; B) Representación gráfica 3D del punto óptimo para la maximización de la productividad total de ácido láctico. ....	67
<b>Figura 12.</b> Cinética de producción de ácido láctico .....	69

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1.</b> Revitalización de la cepa liofilizada del <i>Lactobacillus casei</i> .....	52
<b>Fotografía 2.</b> Adaptación del microorganismo .....	52
<b>Fotografía 3.</b> Banco de células.....	53
<b>Fotografía 4.</b> Atrapamiento de las células del <i>Lactobacillus casei</i> .....	53
<b>Fotografía 5.</b> Agitación de las perlas de alginato de calcio .....	53
<b>Fotografía 6.</b> Lavado de las perlas de alginato de calcio .....	54
<b>Fotografía 7.</b> Proceso de fermentación .....	54
<b>Fotografía 8.</b> Concentración por evaporación de ácido láctico. ....	55

## RESUMEN

El lactosuero es el principal subproducto de la industria láctea, que contiene entre el 50-55% de los nutrientes de la leche y puede ser empleado en la obtención de productos de alto valor agregado. Es así que, el objetivo en este estudio fue obtener ácido láctico a partir de suero por el método de células inmobilizadas del *L. casei* en un proceso continuo. Se tomó en cuenta las variables de temperatura (29.0, 37.0, 45.0°C) y flujo de alimentación (120, 300, 480 ml/h) para encontrar las condiciones que permitan la maximización de la productividad de este metabolito, mediante el uso de un diseño central compuesto utilizando el programa (*Desing Expert 10.0*). Para lograr el estado estacionario se dejó pasar 10 volúmenes de suero dulce con 2.08% m/v de lactosa, previamente pasteurizado a 60°C. Se realizaron 17 corridas experimentales. La validación del modelo se realizó con 3 repeticiones a las mismas condiciones óptimas y se confirmó que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). Se determinó que las mejores condiciones que permiten la maximización de productividad de ácido láctico son a 45°C y 480 ml/h de flujo de alimentación ( $D = 2.4 \text{ h}^{-1}$ ), alcanzando valores máximos de productividad total de 1.36 g/h. Concluyendo que el suero de leche puede ser utilizado en la productividad de ácido láctico en un proceso de fermentación de *Lactobacillus casei* por inmobilización de células, manteniendo el fermentador a un nivel constante de biomasa por períodos prolongados y puede ser la base de eficientes sistemas de fermentación.

**Palabras clave:** Inmovilización celular, *Lactobacillus casei*, suero de leche, diseño central compuesto.

## ABSTRACT

The main product of the dairy industry is whey, it contains between 50-55% of milk nutrients and it can be used to obtain products with high added value. The objective of this study was to obtain lactic acid from sweet whey, by a continuous bioprocess of *Lactobacillus casei* immobilized in Ca-alginate beads. In immobilization, 2% sodium alginate (w/v) and 3% CaCl<sub>2</sub> (w/v) were used. The variables under study were temperature (29.0, 37.0, 45.0°C) and feed flow (120, 300, 480 ml/h). In the search for the conditions that maximize productivity of this metabolite, through the use of a central composite design (*Desing Expert 10.0*). To achieve steady state between runs, 10 volumes (equivalent to beads) of fresh serum with 2.08% (m/v) initial lactose, previously pasteurized at 60°C, were passed. 17 experimental runs were performed. The validation of the model was performed with 3 repetitions at the same optimal conditions and it was confirmed that there is no significant difference ( $p \leq 0.05$ ). The best conditions that maximize lactic acid are 45°C and 480 ml/h of feed flow ( $D = 2.4 \text{ h}^{-1}$ ), reaching maximum total productivity values of 1.36 g/h. Concluding that whey can be used in the production of lactic acid by immobilization of *Lactobacillus casei* cells maintaining the bioprocess at a constant level of biomass for prolonged periods and can be the basis of efficient fermentation systems.

**Key words:** Cellular immobilization, *Lactobacillus casei*, whey, central composite design.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

Según Tuli, Sethi, Khanna y Marwaha (1985), acerca de la producción de ácido láctico a partir de suero permeado por inmovilización del *Lactobacillus casei* se evaluaron dos matrices por su capacidad para inmovilizar las células lácticas del *Lactobacillus casei*; encontrándose que el agar a una concentración del 2% era mejor gel que la poliacrilamida, con respecto a la eficacia para atrapar las células bacterianas (fermentación por lotes).

De los diversos parámetros fisiológicos estudiados se observó, que la temperatura y el pH no tenían influencia significativa sobre la capacidad de fermentación del organismo inmovilizado. Se encontró que se puede trabajar en rangos de temperatura de 40-50°C y pH de 4.5-6.0 en lugar de valores específicos (Tuli et al., 1985).

Se encontró también que el aumento adicional en los niveles de sustrato ensayados (> 4.5% m/v) no mejoró la eficiencia del proceso. La suplementación de Mg<sup>2+</sup> (1 mM) y subproductos agrícolas (torta de aceite de mostaza, 6%) en el medio de permeado de suero mejoró la capacidad de producción de ácido con las células inmovilizadas estudiadas (Tuli et al., 1985).

Según el estudio denominado condiciones óptimas para la producción de ácido láctico a partir de permeado de suero de queso por *Lactobacillus helveticus* atrapado con alginato de calcio, realizado en Canadá por Boyaval y Goulet (1988) afirman: que las células atrapadas en alginato de calcio se caracterizaron por tener mayores índices de fermentación y un pH óptimo que las células libres. El pH óptimo es de 6.7 para las células inmovilizadas y 5.9 para células libres. No se

observó ninguna diferencia en el perfil de la actividad celular frente a la temperatura para cualquiera de los dos tipos de células. Después de un tratamiento térmico, la actividad celular fue mayor para las células libres que para las células inmovilizadas.

## **1.2. PROBLEMA**

En Ecuador, una de las principales actividades es la producción y comercialización de leche y sus derivados. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC] (2018), se contabilizó una producción total diaria de 5.02 millones de litros de leche, de los cuales, aproximadamente 806 mil litros son destinados a la producción de quesos, lo cual representa un 31% de la producción total estimada.

El principal subproducto de la industria quesera es el suero, el que genera una corriente rica en nutrientes, dicho residuo es aproximadamente de 85.7% lo que equivale a decir que por cada 3.5 litros de leche destinados a la elaboración de cuajada la cantidad de suero es de 3 litros, los cuales son destinados, una pequeña parte a la alimentación animal y otra parte en plantas de tratamiento residual con costos elevados, impidiendo de esta manera que la industria láctea pueda competir con industrias de países vecinos.

Entre los componentes más importantes del suero se encuentra la lactosa, este componente puede servir como materia prima para la obtención de varios productos; entre los más importantes se encuentra el ácido láctico que es ampliamente usado en varias industrias como por ejemplo: química, farmacéutica, de alimentos y de plásticos; éste ácido forma actualmente parte de la lista de importaciones del Ecuador, en lo que va del presente año el país ha importado 27.46 toneladas métricas, lo que equivale a un monto aproximado de 47 mil dólares (Banco Central del Ecuador, 2017).

En la actualidad en el país no se aplica ninguna técnica para la obtención de ácido láctico, mientras que en otros países se emplean varios métodos como por ejemplo el de inmovilización que puede usarse en repetidas ocasiones si se compara con otros.

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

El suero al ser un residuo de varias industrias lácteas a nivel país, existe la necesidad de darle un valor agregado, considerando tanto la cantidad de producto existente como el alto valor nutricional que posee.

Haciendo referencia al requerimiento de ácido láctico a nivel país, según Banco Central del Ecuador (2017) es de 77.38 toneladas métricas lo que equivale a un monto total de 151 000 dólares. Con la presente propuesta se pretende desarrollar una tecnología a escala de laboratorio para la obtención de dicho ácido mediante la inmovilización de células, y dotar de la información necesaria para en un futuro realizar el escalonamiento de la industria, propendiendo de esta manera al abastecimiento de la demanda industrial ecuatoriana.

El presente estudio tiene como finalidad ofrecer una alternativa al tratamiento convencional de un residual, en donde al utilizar el suero, aprovechando el contenido de lactosa presente en el mismo, se logre establecer una tecnología a escala de laboratorio para la obtención de ácido láctico, y la generación de una opción que constituya un ingreso más a la industria que a diferencia de la actualidad representa un gasto en el tratamiento de residuos.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Obtener ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*

### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar el suero para la obtención de ácido láctico.
- Determinar parámetros del proceso: flujo de alimentación y temperatura para la obtención de ácido láctico a partir de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*.
- Realizar un estudio cinético de la producción de ácido láctico.
- Caracterizar el ácido láctico obtenido en el proceso.

## **1.5. HIPÓTESIS**

### **1.5.1. HIPÓTESIS NULA**

La temperatura y el flujo de alimentación no influyen sobre la obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*.

### **1.5.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

La temperatura y el flujo de alimentación influyen sobre la obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. INDUSTRIA LÁCTEA**

El sector lácteo es uno de los más importantes de la economía de países industrializados y en desarrollo. Aproximadamente el 90% del volumen total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero, el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción es descartada como efluente, lo cual crea un serio problema ambiental, debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Aider, Halleux y Melnikova, 2009).

#### **2.2. LACTOSUERO**

El lactosuero o suero de leche es un producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración de queso, caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada según el Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN] (2011).

“La composición del suero difiere dependiendo del tipo de coagulación empleado (enzimática, por cuajo o ácida), se clasifica en suero dulce, también conocido como suero de cuajo y suero ácido o suero de queso” (Dairyforall, 2013).

Generalmente en la coagulación ácida pura, el calcio se elimina del complejo de calcio-caseína y el lactato de calcio se forma junto con la leche. La caseína tiende

a precipitar cuando se elimina el calcio. El suero lácteo ácido o suero de queso es suero de leche obtenido durante una coagulación ácida y tiene lactato de calcio (Dairyforall, 2013).

La coagulación enzimática implica la ruptura de la proteína de la leche dando como resultado la formación de para-caseinato de calcio. En esto, el calcio permanece unido en la proteína coagulada. La  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, la inmunoglobulina y la albúmina sérica (las fracciones no caseína) generalmente no se precipitan y permanecen en solución en forma de suero de leche o proteínas séricas (Dairyforall, 2013).

Suero de leche dulce o de cuajo es un suero de leche obtenido durante la coagulación enzimática de la caseína y generalmente está libre de calcio. Por lo tanto, no puede formarse lactato de calcio con ácido láctico. El suero dulce y el suero ácido son individualmente distintos. Los primeros no se pueden convertir en estos últimos incluso con la post-acidificación (Dairyforall, 2013).

Otro tipo de suero de leche, que no se ha descrito anteriormente, es el suero de grado industrial, en el que la coagulación de la proteína se realiza con ácidos distintos del ácido láctico. Por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido acético o ácido sulfúrico (Dairyforall, 2013).

### **2.2.1. COMPOSICIÓN Y TIPOS DE LACTOSUERO**

El lactosuero contiene principalmente lactosa, proteínas como sustancias de importante valor nutritivo, minerales, vitaminas y grasa. La composición y tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado. La lactosa es el principal componente nutritivo (4.5 % p/v), proteína (0.8% p/v), y lípidos (0.5%) (Parra, 2009).

Existen varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6.5. El segundo llamado ácido, resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2003). En la Tabla 1 se detalla la

composición nutricional del lactosuero dulce y ácido, observándose que el dulce tiene mayor lactosa y mayor proteína respecto al ácido.

**Tabla 1.** Composición general del suero fresco.

<b>Componente</b>	<b>Suero de leche dulce (g/l)</b>	<b>Suero de leche ácido (g/l)</b>
Sólidos totales	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Grasa	0-5	0-5
Proteína	6-10	6-8
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fósforo	0.4-0.7	0.5-0.8
Potasio	1.4-1.6	1.4-1.6
Cloruros	2-2.2	2-2.2

**Fuente:** Jelen (2003).

En cualquiera de los dos tipos de lactosuero obtenidos, se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Liu, Chung, Yang y Yousef, 2005). Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4.5-5% p/v), proteínas solubles (0.6-0.8% p/v), lípidos (0.4-0.5% p/v) y sales minerales (8-10% de extracto seco) (Muñi, Paez, Faría, Ferrer y Ramones, 2005). En la Tabla 2 se detalla los requisitos físico- químicos que deben cumplir el lactosuero dulce y ácido según el Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN] (2011).

**Tabla 2.** Requisitos físico- químicos del suero de leche líquido

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Lactosa, % (m/m)	-	5.0	-	4.3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (m/m)	0.8	-	0.8	-	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	-	0.3	-	0.3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	-	0.7	-	0.7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	-	0.16	0.35	-	NTE INEN 13
pH	6.8	6.4	5.5	4.8	AOAC 973.41

El contenido de proteína láctea es igual a 6,38 por el % nitrógeno total determinado.

Fuente: INEN (2011).

### 2.2.2. CONTAMINACIÓN QUE CAUSA AL MEDIO AMBIENTE

El suero, es el principal subproducto de la industria quesera, es considerado como un contaminante importante debido a su elevada demanda biológica de oxígeno. En la actualidad, aproximadamente el 50% de la producción total se deposita en plantas de tratamiento de aguas residuales, el 40% se utiliza para alimentación animal, mientras que sólo el 10% se transforma en concentrados de proteína de suero de leche (WPC), con permeado de suero como subproducto restante (Pescuma, Font de Valdez y Mozzi, 2015).

El suero, a menudo considerado como residuo, tiene una gran cantidad de nutrientes, los mismos que generan aproximadamente 3.5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6.8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido (Muñi et al., 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Almeida, Tamime y Oliveira, 2009).

Una alternativa económica para transformar el suero en productos valiosos es a través de fermentaciones bacterianas o levaduras y por acumulación durante el crecimiento de algas. La fermentación puede aplicarse ya sea para producir compuestos o para formular nuevos alimentos y bebidas. En el primer caso, una

cantidad considerable de biocombustibles capaces de sustituir a los derivados de la gasolina. Además, existe la posibilidad de sustituir los plásticos mediante la síntesis de polímeros biodegradables (Pescuma et al., 2015).

La zona 1 del Ecuador produce un 7.4% del leche a nivel nacional, de los cuales un tercio se utilizan para la producción quesera representando un aproximado de 136.67 m<sup>3</sup> por día, generando 122 m<sup>3</sup> de lactosuero (Orozco, 2015). Como se ha mencionado este líquido traslucido verdoso es uno de los principales contaminantes de la industria láctea debido a su alto volumen y la alta demanda bioquímica de oxígeno (Panesar, Kennedy, Knill y Kosseva, 2010).

La contaminación que produce el suero de leche es debido a los nutrientes que contiene entre los cuales se puede destacar la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) en una proporción de 3.5 kg, la demanda química de oxígeno (DQO) de 6.8 kg en 100 kg de suero de leche líquido, estos valores son equivalentes a las aguas negras producidas por 450 personas (Recinos y Saz, 2006).

Este efluente al ser demandado diariamente a cuerpos de agua disuelve los niveles de oxígeno resultando en un ambiente anaerobio. Por esta razón la descarga directa del suero puede causar problemas ambientales, pero a su vez es una pérdida de nutrientes los cuales pueden ser utilizados para fabricar derivados de interés (Fuertes, Rodríguez y Monteagudo, 2004).

### **2.3. QUESO CAMEMBERT**

De origen francés, se le conocen casi dos siglos de existencia, aunque probablemente ya se hacía antes en la Normandía francesa, donde era preparado por granjeros que lo vendían en aldeas y pueblos (Madrid, 2016).

Según Madrid (2016), el queso camembert se fabrica siguiendo los siguientes pasos:

- Higienización, homogenización y pasteurización (72°C durante 16-20 s) de la leche.
- Adición de cultivo lácteo, para producir ácido láctico a partir de la lactosa. Esto favorece el posterior proceso de coagulación de la leche.

- Adición de cloruro de cálcico, nitrato potásico y cultivo de hongos blancos (*Penicillium candidum*).
- Adición del cuajo (unos 20 ml por cada 100 l de leche). La coagulación se produce en unos 55 a 60 min a 32°C.
- Corte (en trozos de 15 a 30mm), con agitación suave y un pequeño desuerado.
- Llenado en moldes donde el queso se prensa por su propio peso. Hay que voltear los moldes, 3 veces por hora, durante 18 a 24 h.
- Salado durante 60 min en salmuera (22 a 43% de riqueza de sal). También se puede aplicar sal sobre la corteza.
- Secado de los quesos en cámaras a 15 – 18°C con una humedad relativa del 80 – 85%. Este secado puede durar desde 3 – 4 h hasta 2 – 3 días.
- Maduración. En cámaras a 13 – 15°C con una humedad relativa del 90%. Los mohos blancos de la superficie se desarrollan con rapidez, dando su típica apariencia al queso Camembert. La maduración dura de una a dos semanas.

## 2.4. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Por lo general las bacterias ácido lácticas (LAB) son reconocidas como GRAS, estos microorganismos son usados en la preservación y fermentación de alimentos (Roldána et al., 2011), son bacilos que generan ácido láctico a través de la fermentación. Su crecimiento es en condiciones anaeróbicas pero son consideradas anaeróbicas tolerantes; puesto que algunas cepas utilizan el O<sub>2</sub> conjunto con flavoproteína oxidasa con lo que se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se estimula la producción de fosfatos de alta energía, estas bacterias obtienen su energía por medio de la fosforilación del sustrato rico en azúcares como en este caso el lactosuero (Galarza, 2012).

LAB son capaces de crecer en el suero y el permeado del suero y para producir el ácido láctico como producto principal de la fermentación de la lactosa. La producción de ácido láctico por especies de *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*,

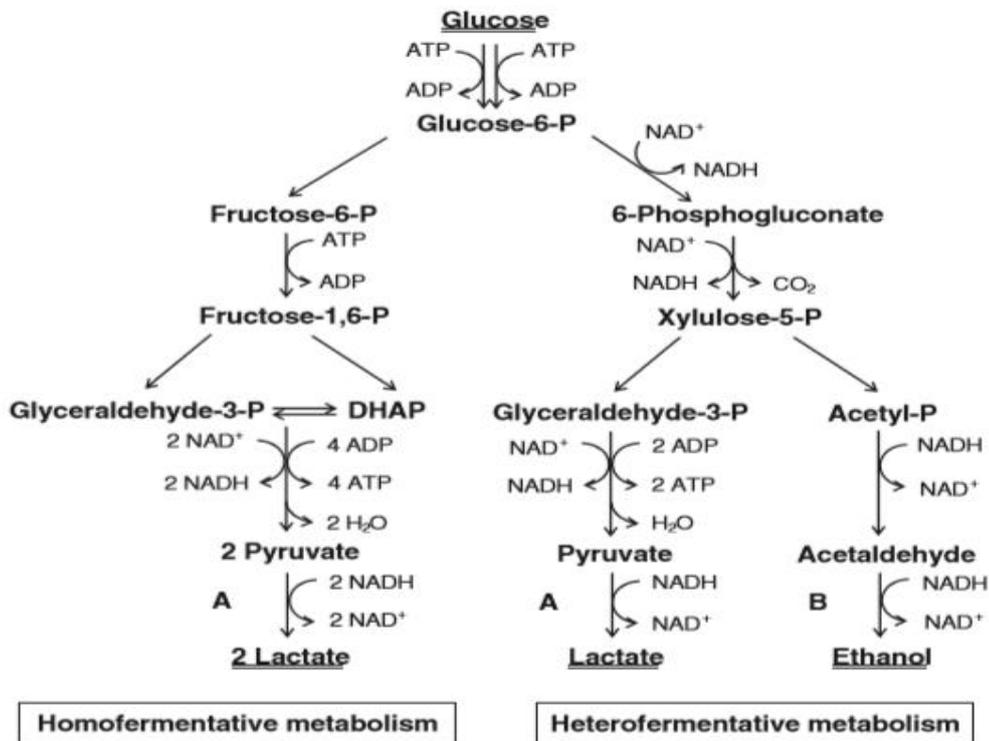
*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* utilizando suero de leche como sustrato de crecimiento. Sin embargo, algunas cepas de LAB no son capaces de crecer en el suero en un grado elevado ya que sus requerimientos complejos de nutrientes no se cumplen; por esta razón, algunos autores han añadido extracto de levadura al suero o desarrollado métodos en los que las células se mantienen en estados no proliferantes (Pescuma et al., 2015).

En la tabla 3, se observan las rutas de fermentación homofermentativas y heterofermentativas, estas bacterias pueden ser homofermentativas obligadas y facultativas lo que da como resultado la configuración del ácido láctico, destacándose *L. casei* la cual produce L+ ácido láctico (García, Paternina y Villadiego, 2010). En la Figura 1 se puede apreciar el proceso que realizan las bacterias homo y heterofermentativas, en donde la diferencia que existe entre estas rutas es la presencia de la enzima aldosa que tiene el grupo homofermentativo, en ausencia de esta enzima los heterofermentativos no pueden fragmentar la fructosa difosfato la cual origina el ácido láctico (Galarza, 2012).

**Tabla 3.** Bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativa y su configuración

<b>Género y especie</b>	<b>Homofermentativa</b>	<b>Heterofermentativa</b>	<b>Configuración ácido láctico</b>
Lactobacillus spp.			
<i>L. delbrueckii</i>	+	-	D(-)
<i>L. lactis</i>	+	-	D(-)
<i>L. bulgaricus</i>	+	-	D(-)
<i>L. casei</i>	+	-	L(+)
<i>L. plantarum</i>	+	-	DL
<i>L. curvatus</i>	+	-	DL
<i>L. brevis</i>	-	+	DL
<i>L. fermentum</i>	-	+	DL

Fuente: García et al. (2010).



**Figura 1.** Fermentación de glucosa por bacterias homo y heterofermentativas.

Fuente: Yang, El Enshasy y Thongchul (2013).

Este género en su mayoría tolera un pH por debajo de 5.0 y una temperatura entre 20 a 45°C por lo que son más competentes frente a otros géneros de bacterias (Castillo, Balciunas, Salgado, Dominguez y Converti, 2013), la temperatura ideal usada para la producción de ácido láctico mediante *Lactobacillus casei* es de 37°C (Panesar et al., 2010). Para realizar el aislamiento de las bacterias ácido lácticas es necesario conservar características ácidas en el medio de cultivo en un ambiente microaerofílico, por lo que el medio Man Rogosa Sharpe (MRS) es el adecuado para las bacterias acidolácticas (Galarza, 2012).

#### 2.4.1. *Lactobacillus casei*

Las bacterias del *Lactobacillus casei* son Gram positivas, catalasa negativas, mesófila, anaerobia, homofermentativa facultativa, tiene forma de bastón, no posee motilidad y no forma esporas (Fernández y del Castillo, 2007). Se encuentran principalmente en vegetales fermentados, carne, leche y sus derivados;

en nuestro organismo se encuentra en los intestinos y la boca, además se encuentra en el medio ambiente (Panesso, Pardo y Sepúlveda, 2015). (Panesso, Pardo, & Sepúlveda, 2015)

Al ser bacterias heterofermentativas facultativas fermentan las hexosas ha ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff en bajas concentraciones de lactosa o glucosa; al contrario, cuando la concentración es alta su principal producto es el ácido láctico (Fernández y del Castillo, 2007).

Los requerimientos de *L. casei* son una temperatura de entre 15 a 45°C siendo la óptima 37°C, pH ácido siendo el óptimo de 5.5; sus requerimientos nutricionales son ácido fólico, pantotenato de calcio, Tween 80 entre otros, algunos de estos compuestos se encuentran en el medio de cultivo MRS que se presenta en la Tabla 4 (Panesar et al., 2010).

**Tabla 4.** Composición de medio de cultivo MRS

<b>Composición</b>	<b>Concentración del medio</b>
Mezcla de peptona	18 g/l
Extracto de levadura	4 g/l
Glucosa	20 g/l
Tween 80	1 ml/l
Fosfato dipotasio de hidrógeno	2 g/l
Citrato triamonio	2 g/l
Acetato de sodio anhidro	3 g/l
Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O	0.2 g/l
Sulfato de magnesio anhidro	0.034 g/l
Agar	12 g/l

**Fuente:** Panesar et al. (2010).

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

## **2.5. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN**

### **2.5.1. PROCESOS CONTINUOS Y DISCONTINUOS**

Los cultivos discontinuos pueden considerarse como un sistema cerrado, excepto para la aireación, que contiene una cantidad limitada de medio, en el que el inoculado pasa a través de un número de fases, según se muestra en la curva típica del crecimiento discontinuo. Mientras que en el cultivo discontinuo todo el sustrato se añade al comienzo de la fermentación, en los procesos discontinuos alimentados el sustrato se va añadiendo a intervalos a lo largo del proceso; esta forma de trabajo elimina los efectos de represión por las fuentes de carbono utilizables rápidamente, reduce la viscosidad del medio y los efectos de los constituyentes tóxicos, o simplemente, hace que la etapa de formación de producto sea lo más larga posible. Los sistemas de cultivo discontinuo alineados a intervalos, o continuos, se utilizan en la mayoría de los procesos de fermentación industrial y están particularmente adaptados a los procesos de fermentación discontinua en los que el producto se forma mayoritariamente después de la fase de crecimiento exponencial. La principal desventaja de las fermentaciones discontinuas cuando se utilizan para la producción de productos asociados al crecimiento, es que la formación eficiente de producto tiene lugar únicamente durante una fracción del ciclo de fermentación. Los sistemas continuos con volúmenes de salida de producto elevado pueden ser, en consecuencia mucho más

eficaces en determinadas aplicaciones en términos de productividad del fermentador (volumen de producción por unidad de volumen por unidad de tiempo,  $\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Las fermentaciones continuas pueden considerarse como un sistema abierto en que el medio se va añadiendo continuamente al biorreactor y se va eliminando simultáneamente igual volumen de medio fermentado. Existen dos tipos principales de reactores continuos, los reactores de mezcla completa y los de flujo pistón (Ward, 1991).

#### **2.5.1.1. Biorreactor Continuo de Flujo Pistón (BCFP)**

La forma de flujo pistón resulta difícil de utilizar con células suspendidas porque obliga a alimentar de forma continua el inóculo  $X_0$ . Además, resulta más difícil mantener los valores de pH o de suministro de nutrientes (en particular  $\text{O}_2$ ) en forma deseada.

Por el contrario, es habitual su uso con células inmovilizadas, sobre todo en biorreactor de lecho de relleno, que facilita la forma de flujo pistón, así como el que se fije la biomasa en un área superficial elevada (Díaz, 2015).

## **2.6. ÁCIDO LÁCTICO**

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por Scheele; siendo considerado inicialmente como un componente de la leche, Lavoisier denominó como ácido láctico a este componente en 1789, siendo finalmente reconocido como un metabolito producido durante la fermentación por Pasteur en el año de 1857 (Parra, 2010). A partir de la contribución de Pasteur se conoce que el ácido láctico se obtiene por la intervención de microorganismos durante la fermentación; consecuentemente la producción de ácido láctico se ha incrementado y continúa incrementándose por los diferentes usos que se da en diferentes áreas (Efremenko, Spiricheva, Veremeenko, Baibak y Lozinsky, 2006).

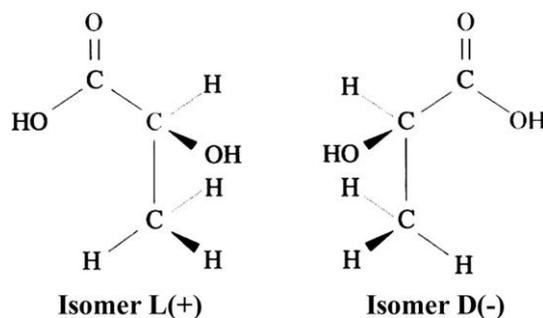
El ácido láctico es considerado GRAS (Generalmente reconocido como seguro) por la FDA (Administración de alimentos y fármacos), es uno de los ácidos orgánicos más utilizados; un ejemplo de esto es su utilización en la industria alimenticia como preservativo, acidulante y saborizante. A su vez su uso en la

industria farmacéutica e industrial como materia prima para la producción de éster de lactato, ácido propanoico, ácido acrílico entre otros (Castillo et al., 2013).

El ácido láctico es un conservante y acidulante natural o sintético. Se obtiene de forma natural por extracción del azúcar de la leche (lactosa) o de forma sintética fermentando azúcar de caña (sacarosa), azúcar de uva (glucosa) o almidón de maíz (maicena) con bacterias del género *Lactobacillus*. Se utiliza para prevenir levaduras y hongos (Aditivos Alimentarios, 2017).

El ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ) es principalmente (90%) producido por fermentación usando bacterias y hongos seleccionados ya que se pueden producir isómeros de ácido láctico individuales mediante este método. Por el contrario, siempre se obtiene una mezcla de ambos isómeros cuando se aplican métodos químicos (Pescuma et al., 2015).

En la figura 2 se muestra la estructura de los isómeros L y D del ácido láctico; los mismos que se emplean: L (+) ácido láctico en la producción de polímeros adecuados para fibras y películas orientadas; también, se emplea como emulsionante y conservante de alimentos, que se utiliza en su forma ácida o como una sal de calcio o de sodio. Por otra parte, el ácido D (-) láctico no se usa individualmente. El ácido láctico se puede producir como una mezcla racémica o como isómeros separados dependiendo de la cepa de LAB seleccionada. En este sentido, demostraron que *L. helveticus* HD100 produjo una mezcla racémica de ácido D- y L-láctico cuando se cultivaba en suero. Por otro lado, se demostró que *L. casei* NBIMCC 1013 produjo solo ácido láctico cuando se cultivaba en cultivos de suero. Según Pescuma et al. (2015), observaron que la producción de ácido láctico era máxima utilizando un sustrato de 20 cultivos (inóculo 2% v/v) cultivado a 37°C y pH 6.5 sin agitación, alcanzando una conversión de lactosa del 95.6% y una concentración de ácido láctico de 33.7 g/l después de 36 h de incubación. De forma contraria, *L. lactis* ATCC 4797 produjo solo ácido D-láctico (12.5 g/l) cuando se creció en permeado de suero que contenía 35 g/l Lactosa en un biorreactor. El rendimiento en ácido láctico se mejoró añadiendo hidrolizado de caseína al suero, permitiendo alcanzar una concentración de 24.3 g/l de ácido D-láctico (puro al 98%) después de 40 h (Pescuma et al., 2015).



**Figura 2.** Estructura de isómeros L y D del ácido láctico

Fuente: Castillo et al. (2013).

### 2.6.1. CARACTERÍSTICAS Y CONCENTRACIONES DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es destinado para distintos usos dependiendo del porcentaje de pureza que tengan, en las tablas 5 y 6 se presentan las características de los mismos y en la tabla 7 se presenta concentraciones comerciales de dicho ácido y el tipo de industria al que va dirigido.

**Tabla 5.** Características del ácido láctico (E270) 80%.

Característica	Descripción
Aspecto	Líquido marrón
Color (Gardner, 1:100 peso)	< 20.00
Densidad a 20°C	1.20 – 1.30 g/ml
Azúcares	< 5.00%
Viscosidad (20°C)	< 200 CPS
Partículas > 1000 μm	Ausencia

Fuente: Pinaluba (2012)

**Tabla 6.** Características del Ácido láctico 90% apto para uso farmacéutico.

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Presión de vapor a 25°C	0.1 hPa
Densidad a 20°C	1.21 g/cm <sup>3</sup>
Solubilidad en agua a 20°C	Soluble
pH a (10g/l, H <sub>2</sub> O, 20°C)	2.8
Punto de fusión	18°C
Punto de ebullición a 20 hPa	122°C

Fuente: KGaA (2013)

**Tabla 7.** Concentraciones comerciales de ácido láctico.

<b>Aplicación</b>	<b>Concentración</b>
Ácido láctico crudo, técnico o comercial	22%, 44%, 50%
Ácido láctico para usos alimenticios	44% y 50%
Ácido láctico transparente o para plásticos	65% y 85%
Ácido láctico grado U.S.P	90%

Fuente: Villatoro (2006).

## **2.6.2. USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO**

Según Aditivos Alimentarios (2017) el ácido láctico se emplea en cervezas, vinos, quesos fundidos, yogures, bollería industrial, salsas, aceitunas, encurtidos, productos derivados de la patata y precocinado. También se utiliza en otras industrias como por ejemplo:

### **2.6.2.1. Industria alimenticia**

El ácido láctico en la industria alimentaria ha sido usado como acidulante, preservante y regulador de pH. Además de estas propiedades se ha reportado que ayuda a la microflora intestinal; actuando sobre algunos tipos de microorganismos patógenos, su actividad bactericida también se ha usado efectivamente en

combinación con ácido acético. A continuación, se detalla su uso en la industria alimentaria.

#### **2.6.2.2. Confitería**

En la confitería su uso ayuda a obtener un pH adecuado durante la cocción de los confites. Además, es usado como acidulante, el ácido láctico ha sido comparado con el ácido cítrico; teniendo mejores resultados por la impartición de una acidez más suave, duradera y además no afecta la estabilidad del producto (Sortwell, 2004).

El ácido láctico tamponado líquido es usado para la producción de jarabes líquidos, los cuales tienen un punto de ebullición alto, el ácido láctico hace bombones más claros con menor inversión de azúcar y sin aire atrapado en ellos (Jarrett, 2012).

#### **2.6.2.3. Bebidas**

Al igual que en la confitería el ácido láctico es usado como acidulante en jugos o gaseosas aromatizados; el uso de ácido láctico tamponado no enmascara ni sustituye el sabor natural, dejando un sabor más persistente en la bebida (Vijayakumar, Aravindan y Viruthagiri, 2008).

En la cerveza natural el ácido láctico es uno de sus componentes, se emplea durante la maceración y cocción del mosto, durante estas etapas se mejora la estabilidad microbiana y mejora su sabor (Jarrett, 2012; Vijayakumar et al., 2008).

#### **2.6.2.4. Envasado de conservas**

Las conservas como aceitunas, pepinillos, encurtidos son envasadas junto con sal, ácido láctico y agua. La sal de lactato de calcio es usada como sal reafirmante en enlatados de frutas y vegetales (Vijayakumar et al., 2008).

#### **2.6.2.5. Productos cárnicos**

El ácido láctico es usado como agente antimicrobiano durante las operaciones de matadero, reduciendo la infección de la carne por Salmonella. La adición de ácido láctico durante el procesamiento de la carne aumenta la vida útil y reduce la

contaminación por *Clostridium botulinum* en descomposición aerobia (Egan, 1983).

#### **2.6.2.6. Industria panadera**

Se utiliza para acidificar los panes, el ácido láctico usado en la panadería brinda mejores resultados como un pan más grande o pesado, mejora visualmente la corteza; agregado directamente a las galletas su masa fermentada es más crujiente (Latif y Masud, 2006).

Entre los beneficios económicos el ácido láctico aumenta la estabilidad y el volumen de la mantequilla, reduciendo la cantidad de manteca usada y optimizando el horneado. La albumina del huevo puede ser reemplazada por el lactato de calcio de menor valor (Latif y Masud, 2006; Vijayakumar et al., 2008).

#### **2.6.2.7. Industria farmacéutica**

La industria farmacéutica utiliza el isómero L (+) del ácido láctico, puesto que este isómero puede ser metabolizado por el cuerpo humano. El ácido láctico y sus sales son usadas por esta manufactura por su capacidad de suplementar energía y volumen a los cuerpos responsables de la regulación del pH, también es usado en algunas fórmulas por mostrar actividad antitumoral (Alsaheb et al., 2015).

#### **2.6.2.8. Industria cosmética**

Estudios han encontrado que el ácido láctico tiene un papel esencial e importante en la renovación y cuidado de la piel. Entre esto destaca la estimulación de la producción de elastina, colágeno y melanina, además exfolia la superficie de la piel y mejora la renovación celular (Morganti, 1996).

### **2.6.3. FACTORES DE ESTUDIO EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**

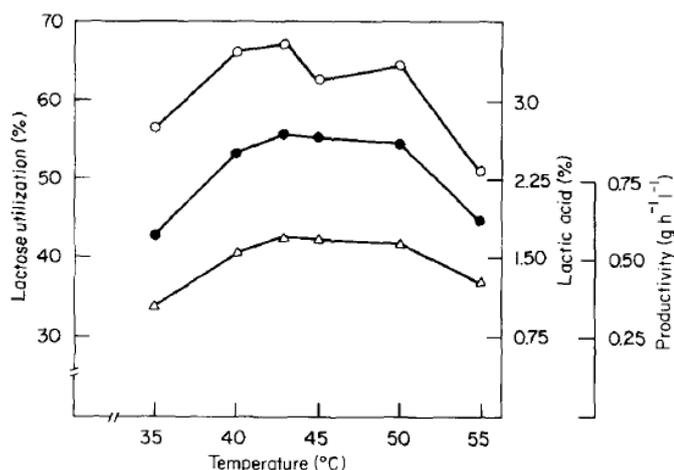
#### **2.6.3.1. Efecto de la temperatura**

Para encontrar la temperatura óptima en el suero para la producción de ácido láctico, después de la inoculación Panesar et al. (2010), incubaron en un rango de temperatura de 30- 45°C. La utilización de la lactosa y la producción de ácido láctico aumentan con el aumento de la temperatura hasta 37°C; sin embargo, una

insignificante disminución de las funciones fue encontrada a 40°C. Otras temperaturas probadas muestran valores bajos de lactosa utilizada y producción de ácido láctico. La máxima producción de ácido láctico es de 33.75 g/l a 37°C (Panesar et al., 2010).

La temperatura también es uno de los factores importantes que influyen en la actividad metabólica de enzimas celulares. Las enzimas son más activas durante la temperatura óptima y la reacción enzimática avanza a velocidad máxima. Sin embargo, por encima y por debajo de la temperatura óptima es la disminución de la tasa de reacción que causa los problemas en el metabolismo celular (Panesar et al., 2010).

Las investigaciones de optimización de la temperatura que se observan en la figura 3 no mostraron una influencia significativa de la temperatura entre 40-50°C en la eficiencia de conversión y la tasa de producción de ácido láctico por células inmovilizadas. Sin embargo, los valores extremos de 35°C y 55°C probados redujeron la formación del producto. En otro trabajo, un rango de temperatura de 43 a 53°C también se ha encontrado que no tiene ningún efecto sobre la capacidad de fermentación del ácido láctico de *L. delbrueckii* (Tuli et al., 1985).



**Figura 3.** Influencia de la temperatura y utilización de lactosa en la producción de ácido láctico en fermentación discontinua.

Fuente: Tuli et al. (1985).

## **2.7. INMOVILIZACIÓN CELULAR**

Cruz (2007) señala que la inmovilización celular “es una técnica utilizada para incrementar la viabilidad de las bacterias”.

Dentro de la industria alimentaria, la inmovilización de microorganismos en soportes naturales o sintéticos proporciona estabilidad a las funciones celulares. Permite alcanzar altas concentraciones celulares en volúmenes reducidos, así como la reutilización como biocatalizador y la implantación de sistemas continuos de producción (Dominguez, 2015).

Los métodos de inmovilización celular pueden ser divididos en dos categorías: unión química en este tipo se encuentran la unión a soportes, estos pueden ser orgánicos, inorgánicos y sintéticos y retención física en este tipo se encuentran la encapsulación celular y atrapamiento celular (Cruz, 2007).

### **2.7.1. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN MÁS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**

#### **2.7.1.1. Atrapamiento en alginato de calcio**

El atrapamiento de las células en las perlas de gel de alginato de calcio es el método más utilizado para la inmovilización de las bacterias del ácido láctico debido a su simplicidad, no toxicidad, condiciones de gelificación suave y facilidad de uso (Linko, 1980).

Hacer una suspensión de 15 ml de células de *L. casei*, *L. lactis*, o una mezcla de ambas cepas luego mezclarlas con 10 ml de una solución al 10% de alginato de sodio estéril. La mezcla fue extruida, gota a gota con una bomba peristáltica en un 2% estéril CaCl<sub>2</sub> solución en habitación temperatura, agitando continuamente. Los cordones (2-3 mm de diámetro) se endurece en el CaCl<sub>2</sub> solución durante 2 h. Las partículas fueron lavadas con suero fisiológico estéril para eliminar el exceso de iones de calcio y celdas atrapadas (Tuli et al., 1985).

#### **2.7.1.2. La inmovilización de células en carragenina y agar**

Diez mililitros de 3% κ-carragenina (Sigma, C-1013) o 2.5% de agar disuelto en solución salina fisiológica fueron esterilizadas a 121°C durante 15 min. Después

de enfriar a 45-50°C, 5 ml de la suspensión celular de *L. casei*, *L. lactis*, o mezcla, a una temperatura de 35-40°C, fueron agregados y la mezcla resultante se deja solidificar durante 30 min a temperatura ambiente. Después de este tratamiento, el gel fue cortado en partículas de tamaño adecuado (4 x 4 x 2 mm). En el caso de inmovilización de células en  $\kappa$ -carragenina, las partículas se endurecen en 2% KC1 solución estéril durante 2h. Las partículas se lavaron con 0.7% de solución de KCl estéril para retirar células atrapadas (Boyaval y Goulet, 1988).

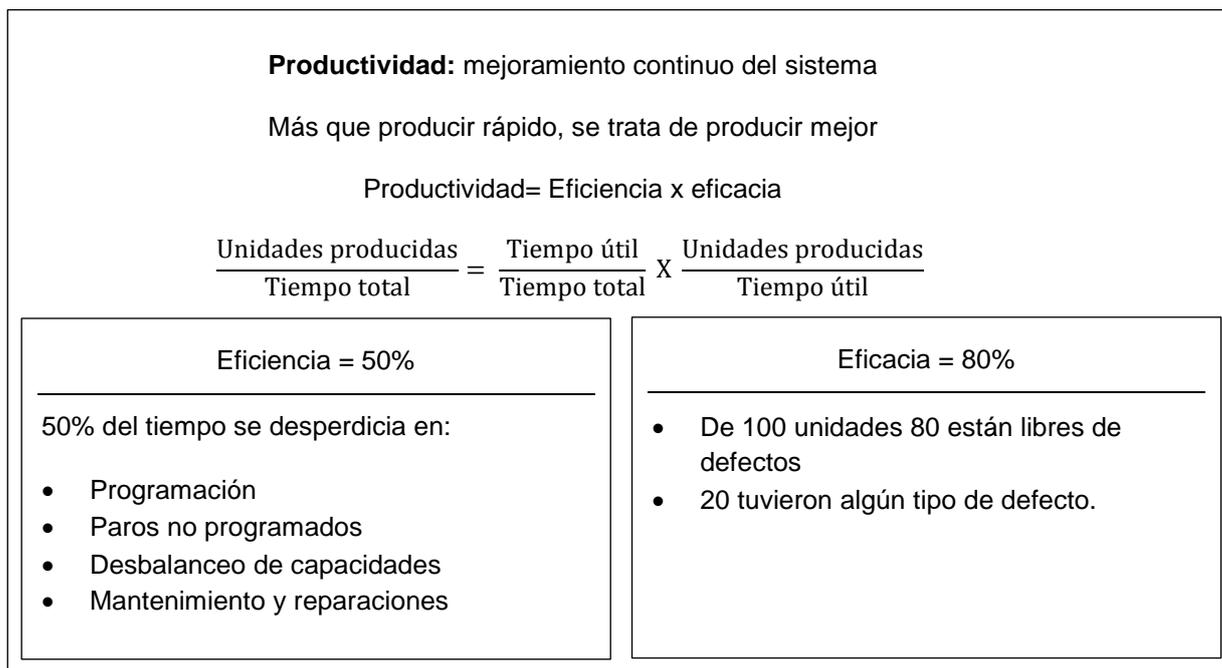
### **2.7.1.3. Inmovilización de células en poliacrilamida**

Cinco mililitros de una suspensión de células de *L. casei*, *L. lactis*, o mezcla celular fueron agregadas a 10 ml de suero fisiológico salino estéril que contiene 2 g de acrilamida monómero, 0.11 g de N-N'- metilen-bis-acrilamida, 0.03 g de potasio y 0.1 ml de 87% dimetilaminopropionitrilo. La mezcla se deja solidificar durante 30 min a temperatura ambiente y luego el gel fue cortado en partículas de 4 x 4 x 2 m (Boyaval y Goulet, 1988).

## **2.7. PRODUCTIVIDAD**

La productividad tiene que ver con los resultados que se obtienen en un proceso o un sistema, por lo que incrementar la productividad es lograr mejores resultados considerando los recursos empleados para generarlos (Gutiérrez, 2014).

Es usual ver la productividad a través de dos componentes: eficiencia y eficacia como se puede observar en la figura 4. La primera es simplemente la relación entre el resultado alcanzado y los recursos utilizados, mientras que la eficacia es el grado en que se realizan las actividades planeadas y se alcanzan los resultados planeados; en otras palabras, la eficacia se puede ver como la capacidad de lograr el efecto que se desea o se espera. (Gutiérrez, 2014).



**Figura 4.** La productividad y sus componentes.

Fuente: Gutiérrez (2014).

## 2.8. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie de respuesta (MSR) fue introducida por primera vez, por Box y Wilson en el año de 1951. La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

##### 3.1.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

Las pruebas preliminares y el desarrollo experimental se realizarán en las instalaciones del laboratorio de las Unidades Eduproductivas de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales.

Los análisis se realizarán el laboratorio de análisis fisicoquímico y microbiológico de la facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte. Los datos climatográficos se detallan en la tabla 8 presentada a continuación:

**Tabla 8.** Datos Climatográficos

<b>Provincia:</b>	<b>Imbabura</b>
Cantón:	Ibarra
Ubicación:	0°17'30"y 0°22'30" de latitud norte y sur 78°05'00"y 78°09'00" de longitud este y oeste.
Altitud:	2225 m.s.n.m.
Clima:	Se caracteriza por un clima templado seco con una temperatura promedio de 18°C
Precipitación:	623mm/año

**Fuente:** Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra (2017).

## **3.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

### **3.2.1. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

- Suero dulce
- Cepas del *Lactobacillus casei*
- Agar MRS
- Caldo MRS
- Alginato de sodio
- Cloruro de calcio, CaCl<sub>2</sub>
- Agua Esterilizada, H<sub>2</sub>O

### **3.2.2. EQUIPOS**

- Biorreactor Smart Gx
- Incubadora
- Microscopio
- Estufa
- Autoclave
- Equipo de refrigeración
- Contador de colonias
- Centrifugadora
- Balanza gramera
- pH-metro
- Vortex Mixer
- Bomba peristáltica

### **3.2.3. MATERIALES**

- Vasos de precipitación
- Probeta
- Pipetas y micro pipetas
- Porta y cubre objetos

- Cajas Petri
- Mechero de Bunsen
- Asas
- Matraz
- Gradilla
- Tubos Eppendorff
- Tubos Falcon
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Pinzas
- Espátula

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. CONDICIONES DE LA MATERIA PRIMA

En la presente investigación se va a utilizar lactosuero fresco, de acuerdo a las características descritas en la tabla 9, este va a ser receptado de la industria Floralp, debe recibir un previo tratamiento, el cual consiste en una pasteurización a 60°C por 15 minutos.

##### 3.3.1.1. Caracterización del suero

**Tabla 9.** Análisis físico- químicos para el lactosuero dulce

ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO	MÉTODO DE ENSAYO
Sólidos totales	AOAC 984.15
Proteína	AOAC 960.52
Grasa láctea	AOAC 920.85
Ceniza	NTE INEN 786
Acidez titulable % (calculada como ácido láctico)	AOAC 954.07
pH	AOAC 973.41

**Fundamento de los métodos usados:****Sólidos totales:**

Según el método para establecer los sólidos totales por la AOAC 984.15, se basa en determinar la diferencia entre el peso fresco del alimento y el contenido de agua presente en el mismo, el que es denominado como contenido de materia seca, el cual se realiza en una estufa y el resultado se expresa generalmente en gramos por kilogramo (g/kg) o en tanto por ciento (%).

**Proteína:**

Según el método para determinar proteína Kjeldahl por la AOAC 960.52, se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, se determina por titulación. El factor para leche es de 6.38.

**Grasa láctea:**

Según el método para determinar grasa Gerber por la AOAC 920.85, se basa en separar la grasa dentro de un recipiente medidor, llamado butirómetro, de dimensiones estandarizadas (DIN 12836), medir el volumen e indicarlo en un tanto por ciento en masa.

**Ceniza:**

Según el método para establecer la ceniza por la NTE INEN 786, se basa en determinar el residuo inorgánico que existe después de calcinar la materia orgánica mediante la utilización de la mufla.

**Acidez titulable:**

Según el método para determinar la acidez titulable por la AOAC 954.07, se basa en determinar el volumen de NaOH estándar necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula, determinando el punto final por medio del cambio de color que se produce por la presencia del indicador ácido-base empleado

La acidez titulable se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$A = 0.090 \frac{VxN}{m1 - m} x100$$

Dónde:

A= acidez titulable (% de ácido láctico)

V= volumen de la solución de hidróxido de sodio ocupado en la titulación

N= normalidad de la solución de hidróxido de sodio

M= masa del matraz Erlenmeyer vacío en g

M1= masa del matraz Erlenmeyer con la muestra en g

**pH:** Según el método potenciométrico para determinar el pH por la NTE INEN 786, se basa en establecer una diferencia de potencial entre dos disoluciones con distinta [H+] (pH de una muestra con el de una disolución patrón de pH conocido).

### **3.3.2. DETERMINAR PARÁMETROS DE PROCESO DE FLUJO DE ALIMENTACIÓN Y TEMPERATURA PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DEL *Lactobacillus casei***

En la presente investigación se utilizará la metodología de superficie de respuesta, en un diseño de dos factores a tres niveles para encontrar el punto óptimo de flujo y temperatura, para la obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*. Para el análisis estadístico se empleó un paquete estadístico *Design Expert* 10.0.

#### **3.3.2.1. Factores a estudiar**

Los factores que se estudiarán son la temperatura y el flujo de alimentación, determinando la mejor combinación para la caracterización del ácido láctico:

**Tabla 10.** Factor A: Temperatura

<b>NIVEL</b>	<b>T</b>
<b>A1:</b>	29°C
<b>A2:</b>	37°C
<b>A3:</b>	45°C

**Tabla 11.** Factor B: Flujo de alimentación

<b>NIVEL</b>	<b>F</b>	<b>D</b>
<b>B1:</b>	120 ml/h	0.6 h <sup>-1</sup>
<b>B2:</b>	300 ml/h	1.5 h <sup>-1</sup>
<b>B3:</b>	480 ml/h	2.4 h <sup>-1</sup>

**Nota:** Para realizar la comparación con otros autores se tomó como referencia el factor de dilución (D), el cual se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$D = \frac{F}{V}$$

**Donde:**

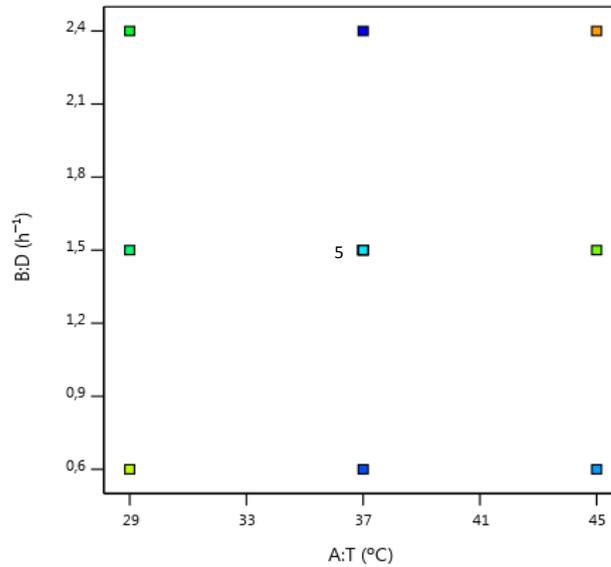
- **D** = Dilución
- **F** = Flujo de alimentación
- **V** = Volumen de perlas

### **3.3.2.2. Tratamientos de estudio**

El diseño experimental en este estudio evaluará 13 tratamientos; de los cuales, se propone cinco repeticiones al punto central como se muestra en la figura 5.

**Tabla 12.** Descripción de tratamientos a evaluarse.

<b>Nº</b>	<b>Simbología de los tratamiento</b>	<b>Tratamientos</b>
1	T1	A2B1
2	T2	A3B1
3	T3	A1B1
4	T4	A2B2
5	T5	A2B2
6	T6	A1B2
7	T7	A2B2
8	T8	A3B2
9	T9	A2B2
10	T10	A2B2
11	T11	A2B3
12	T12	A1B3
13	T13	A3B3



**Figura 5.** Distribución de las variables de estudio en forma gráfica.

### 3.3.2.3. Características de la unidad experimental

Cada unidad experimental tendrá un volumen de 2 litros de suero dulce

### 3.3.2. REALIZAR UN ESTUDIO CINÉTICO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Para dar cumplimiento a este objetivo se realizará una gráfica de la tasa de producción total de ácido láctico (AP) con respecto al volumen de suero de leche que ha sido pasado en los diferentes flujos de alimentación, para poder identificar el momento que existe una mayor producción de dicho ácido.

### 3.3.3. CARACTERIZAR EL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO EN EL PROCESO

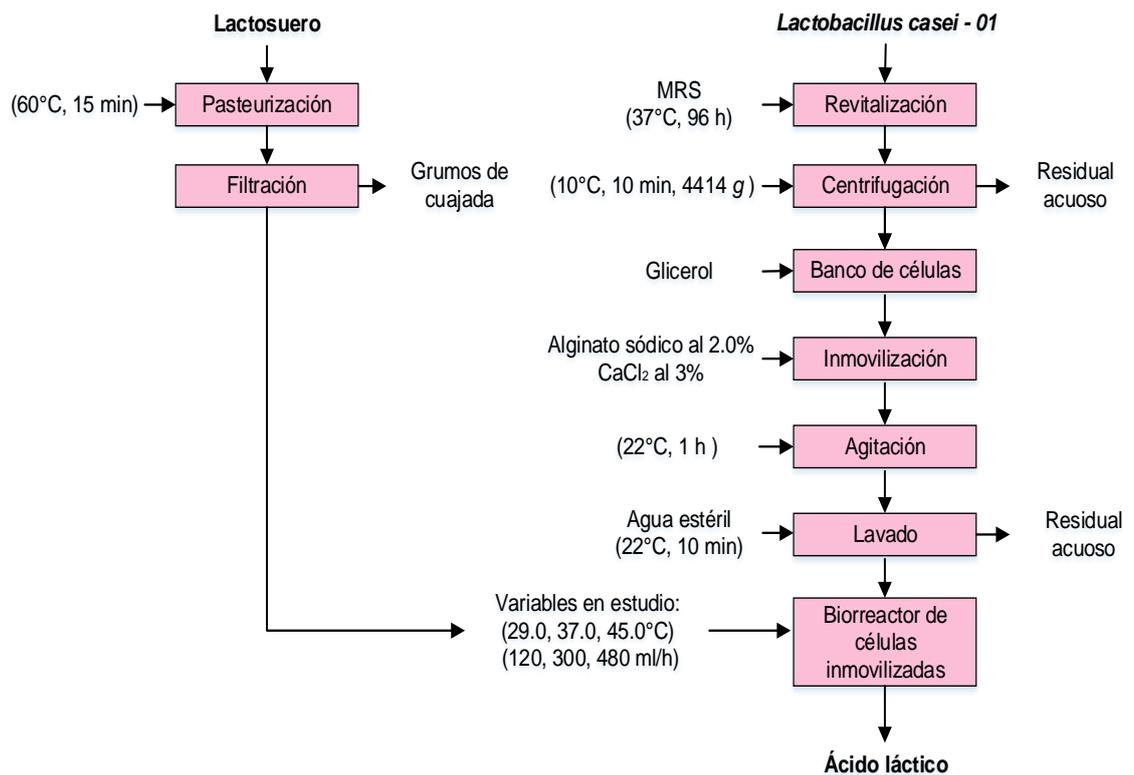
Para la caracterización es necesario verificar la pureza del ácido láctico para de esta manera poder identificar la utilización de dicho ácido y destinarlo a una industria sea alimentaria, farmacéutica o de plásticos, para lo cual se realizará diferentes análisis físico-químicos, los mismos que se encuentran detallados en la tabla 13.

**Tabla 13.** Análisis físico- químicos para el ácido láctico.

ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO	MÉTODO DE ENSAYO
Densidad	NTE INEN 11
Lactosa	AOAC 984.15
pH	AOAC 973.41

### 3.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

El proceso de obtención de ácido láctico a escala de laboratorio es explicado a continuación en el manejo específico del experimento (figura 6).



**Figura 6.** Diagrama de bloques para la obtención de ácido láctico

## **DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE BLOQUES:**

### **Recepción de materia prima**

Se recibió suero dulce en recipientes esterilizados, subproducto del procesamiento de leche en la elaboración de quesos camembert de la industria Floralp, la materia prima deberá cumplir con las características descritas en la tabla número 2.

### **Pasteurización**

Se pasteurizó a una temperatura de 60°C por un tiempo de 15 min; temperatura a la cual existe muerte celular de microorganismos usados en la producción quesera pero la misma no afecta a la desnaturalización de proteínas presentes, además de eliminar grasa o residuos (Engineers, 2011).

### **Filtración**

Se realizó con la ayuda de un tamiz estéril para eliminar las impurezas y grumos resultantes luego de la pasteurización.

### **Revitalización de la cepa liofilizada del *Lactobacillus casei***

El proceso de revitalización se realizó en una cabina de flujo laminar a fin de evitar posibles contaminaciones durante el proceso de revitalización. Con la ayuda de una balanza se tomó 0.01 g de *L. casei* - 01, esto se colocó en un tubo de ensayo con 10 ml de medio líquido MRS formando una suspensión uniforme, posteriormente se incubó por 24 h a 37°C, después de este periodo se deberá tomar un 1 ml y se le agregará a 9 ml de caldo MRS e incubar a 37°C durante 6 h. Del caldo se tomará 1 ml y se realizarán siembras en profundidad estrías en Agar MRS y se incubarán a 37°C durante 48 h.



**Fotografía 1.** Revitalización de la cepa liofilizada del *Lactobacillus casei*

Una vez revitalizadas la cepa *Lactobacillus casei*, se tomó una colonia de una caja petri inoculando un erlenmeyer con 200 ml de medio líquido MRS; este se dejó incubar por 24 h a 37°C.



**Fotografía 2.** Adaptación del microorganismo

### **Centrifugación**

Las células se cultivaron a 37°C durante 24 h y se recogerán mediante centrifugación (4414 g, 10 min) a 10°C.

### **Banco de células**

Se esterilizo en autoclave tubos eppendorf, puntas de micro pipeta y glicerol por 15 min y temperatura de 121°C. En cámara de flujo laminar con asepsia, se tomó 500 µl de biomasa con una punta estéril colocándolo en un tubo eppendorf, tomando otra punta estéril se colocó 500µl de glicerol, usando vortex se mezcló el glicerol con la biomasa, posteriormente se colocó los tubos eppendorf a una temperatura de -20°C.



**Fotografía 3.** Banco de células

### **Atrapamiento de alginato de sodio**

Se dispensó en una solución de alginato sódico al 2.0%, dejando gotear con ayuda de una pipeta de sobre la solución de  $\text{CaCl}_2$  al 3.0%, permitiendo atrapar las células dentro de ellas.



**Fotografía 4.** Atrapamiento de las células del *Lactobacillus casei*.

### **Agitación**

Las perlas se agitaron durante 1 h a 22°C para garantizar el intercambio iónico máximo del  $\text{Na}^+$ .



**Fotografía 5.** Agitación de las perlas de alginato de calcio

## Lavado

Se realizaron dos lavados con agua estéril a temperatura ambiente durante 10 min.

El diámetro medio de las perlas fue  $1.5 \pm 0.02$  cm.



**Fotografía 6.** Lavado de las perlas de alginato de calcio

## Biorreactor de células inmobilizadas

El proceso de fermentación se llevó a cabo en un biorreactor tipo pistón de alimentación continua figura 1, conectado mediante mangueras a la bomba peristáltica con control de velocidad para la entrada del lactosuero, se trabajó con un volumen de perlas de 200 ml. Para lograr el estado estacionario entre corridas se dejó pasar 10 volúmenes de perlas con suero previamente pasteurizado a 60 °C. Las condiciones de trabajo fueron a temperaturas (27, 37 y 47 °C) y flujos de alimentación (120, 300 y 480 ml/h), determinando productividad total de ácido láctico (g/h).



**Fotografía 7.** Proceso de fermentación

## Ácido láctico

Se va a evaluar el ácido láctico obtenido mediante la realización de análisis físico-químicos descritos en la tabla 13 y mediante estos se va a conocer las propiedades de dicho ácido.



**Fotografía 8.** Concentración por evaporación de ácido láctico.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL SUERO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En la estandarización del bioproceso se comenzó por la caracterización del suero de leche que va a ser utilizado como sustrato, para verificar los componentes del mismo. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos del lactosuero.

**Tabla 14.** Características físico- químicos del lactosuero de leche.

Componentes del lactosuero						
Grasa (% m/m)	Proteína total (% m/m)	Lactosa (% m/m)	Sólidos totales (% m/m)	Acidez titulable %	pH	Referencias
0.35	0.46	2.08	3.75	0.07	6.8	Este estudio
0.3	0.8	≤ 5.0	-	≤ 0.16	6.8-6.4	(INEN, 2011)

La caracterización del lactosuero pasteurizado tuvo una composición en lactosa de 2.08% y de proteína total de 0.46%N. El pH del suero (6.8) lo define como un suero dulce. Los valores obtenidos están dentro de los rangos aceptables de acuerdo a lo que establece la Normativa Técnica Ecuatoriana de suero de leche líquido NTE INEN 2594:2011. El contenido de lactosa es uno de los componentes más contaminantes que presenta el suero de leche. En este caso representa la principal fuente de carbono para el metabolismo de la cepa de *Lactobacillus casei*. La variabilidad en la composición del lactosuero depende de la raza, la

alimentación del ganado vacuno, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado según (Parra, 2009).

#### **4.2. DETERMINAR PARÁMETROS DEL PROCESO: FLUJO DE ALIMENTACIÓN Y TEMPERATURA PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DEL *Lactobacillus casei***

Al finalizar con los experimentos propuestos en el diseño, se procedió a encontrar las condiciones de fermentación óptimas que maximicen la productividad de ácido láctico, el programa de cómputo *Design Expert 10.0*, proporcionó los datos del modelo, ANOVA y posibles combinaciones de las variables independientes que cumplan con las condiciones máximas de productividad del metabolito, tal como se describe en la figura 7.

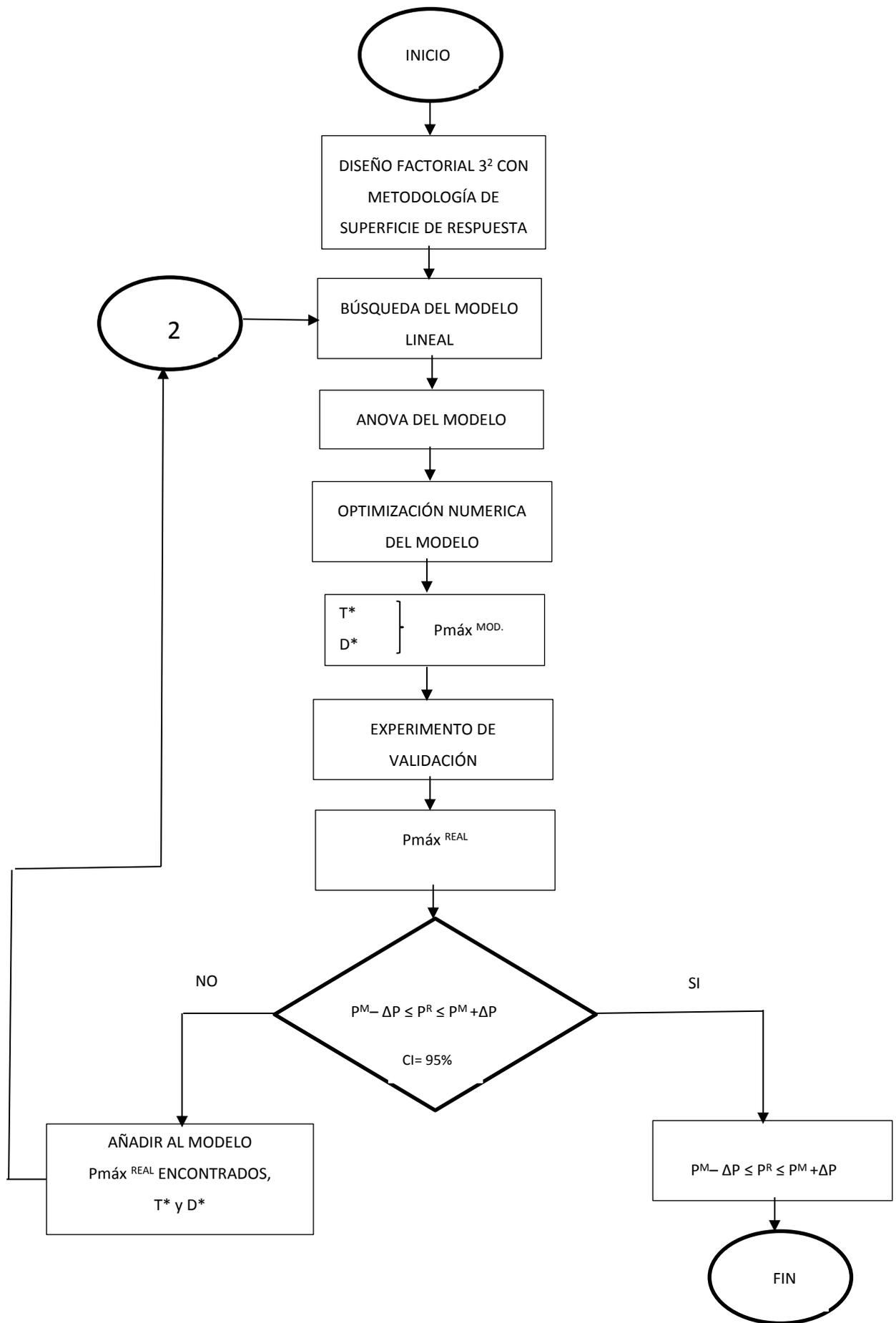


Figura 7. Diagrama para la maximización de la productividad de ácido láctico

Para la optimización de las condiciones de fermentación se realizaron los tratamientos propuestos por el diseño experimental (tabla 12), mediante los valores reales obtenidos en la experimentación de la productividad de ácido láctico se ajustó y se validó debidamente el modelo, y se procedió a explorar la superficie descrita por el mismo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado el punto óptimo (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

#### 4.2.1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

En la tabla 15, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del modelo sugerido y el análisis estadístico de la variable de respuesta que fue obtenido mediante la experimentación, el análisis de varianza de la variable de respuesta permitió conocer si el modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo que nos permita obtener la mayor productividad total de ácido láctico.

El análisis de varianza para la productividad total de ácido láctico muestra que el valor-p del modelo utilizado para la variable de respuesta es significativo debido a que muestra un valor-p < 0.05.

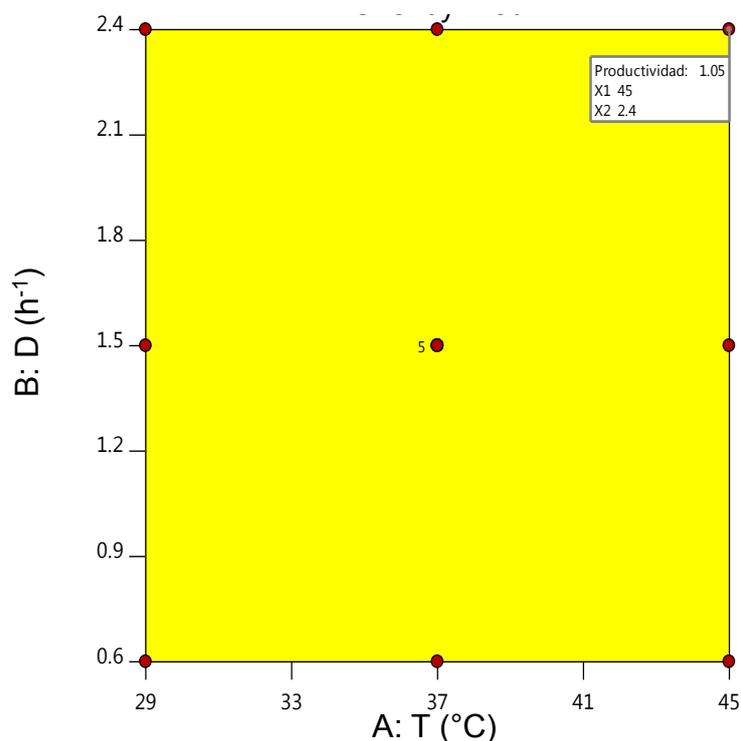
**Tabla 15.** ANOVA para el modelo de primer orden de la productividad total de ácido láctico (g/h) para la optimización de las condiciones de fermentación.

<b>Productividad de ácido láctico (g/h)</b>					
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor-P Prob&gt;F</b>
Modelo	2	0.4635	0.2317	31.4368	<0.0001
A-T	1	0.0368	0.0368	4.9943	0,0494
B-D	1	0.4267	0.4267	57.8793	<0.0001
Residual	10	0.0737	0.0074		
Falta de ajuste	6	0.0672	0.0112	6.9174	0,0411
Error Puro	4	0.0065	0.0016		
Correl Total	12	0.5372			
R <sup>2</sup>		0.8628			
R <sup>2</sup> Ajustado		0.8353			
C.V. %		12.0927			
Prec. Ad		16.7293			

En el análisis del ANOVA del modelo de primer orden de la productividad de ácido láctico muestra que, la temperatura (A) y el factor de dilución (B), fueron significativos, ya que todos presentaron un valor  $<0.0001$ .

Además en el análisis de varianza muestra que, el Valor-F del Modelo de 31.4368 es significativo, y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj.}$ ) de 0.8353 indica que el modelo utilizado para la búsqueda del punto óptimo es satisfactorio, ya que según Gutiérrez y de la Vara (2008) si el modelo no muestra un mínimo de 0.70 del comportamiento en la respuesta, en términos de ( $R^2_{aj.}$ ), no se recomienda utilizarlo para fines de optimización ya que su predicción es mala.

La figura 8 indica los valores sugeridos mediante la optimización numérica del modelo mediante el uso del paquete estadístico *Design Expert 10.0*, y para su validación se realizaron tres experimentos con los puntos óptimos ( $45^\circ\text{C}$  ( $T^*$ ) y  $2.4 \text{ h}^{-1}$  ( $D^*$ )).



**Figura 8.** Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo.

Los resultados obtenidos tras los experimentos de validación no cumplieron con los valores planteados en el modelo (Tabla 16).

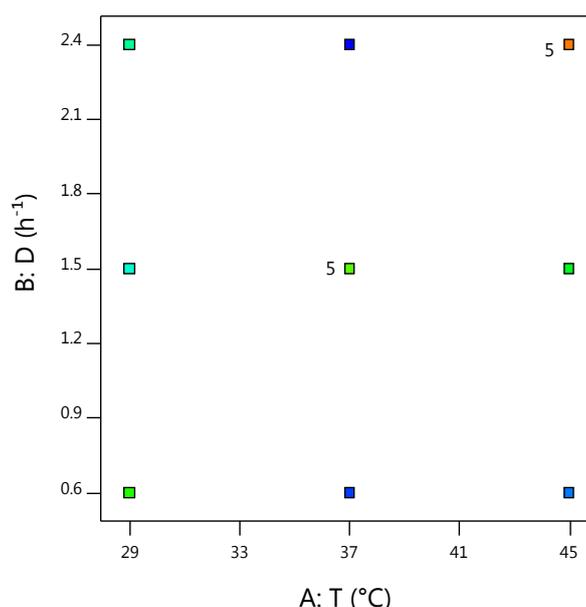
**Tabla 16.** Condición óptima predicha y real para la maximización de la productividad de ácido láctico

Respuesta	Media Predicha	Desv. Est.	95% IP Bajo	Media Real	95% IP Alto
<b>Productividad total (g/h)</b>	<b>1.06</b>	0.09	0.90	<b>1.38</b>	1.21

Se esperaba obtener valores de la productividad total de ácido láctico entre el rango de 0.90 a 1.21 pero tras la experimentación se obtuvieron valores promedio entre 1.38 lo cual indica que, si existió diferencia significativa entre los valores predichos con los reales, por lo cual fue necesario reajustar el modelo.

#### 4.2.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL NUEVO DISEÑO EXPERIMENTAL

Debido a que no se cumplió con la precisión del modelo, se procedió a añadir al diseño los nuevos valores encontrados de temperatura óptima ( $T^*$ ) y el factor de dilución óptimo ( $D^*$ ) del modelo anterior (Figura 9)



**Figura 9.** Plot de contorno de los valores de maximización sugeridos mediante la optimización numérica del modelo.

#### **4.2.3. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LA NUEVA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE PRODUCTIVIDAD TOTAL DE ÁCIDO LÁCTICO**

Mediante la nueva búsqueda del punto óptimo para la maximización de la productividad de ácido láctico se ajustó y validó el modelo de manera correcta para encontrar la combinación de factores que den por resultado el nuevo punto óptimo explorando en la superficie de respuesta.

Se obtuvieron los valores reales de respuesta de la variable dependiente que se ajustaron a un modelo lineal para la productividad de ácido láctico.

Los modelos de primer orden usados para determinar el punto óptimo entre flujo de alimentación y temperatura fueron:

- Ecuación final en términos de factores reales:

$$\text{Productividad} = 0.019968 A + 0.386749 B - 0.571354$$

- Ecuación final en términos de factores codificados:

$$\text{Productividad} = 0.1597 A + 0.3481B + 0.7476$$

Donde:

**P:** Productividad total de ácido láctico (g/h)

**A:** Temperatura (°C)

**B:** Factor de dilución (h<sup>-1</sup>)

Las ecuaciones en términos reales se utilizaron para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada factor. Mientras que, las ecuaciones codificadas fueron útiles para identificar el impacto relativo de los factores al comparar los coeficientes del factor (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

**Tabla 17.** Resultados de productividad total de ácido láctico

Corr.	Temperatura (°C)	Factor de dilución (h <sup>-1</sup> )	Productividad total (g/h)
1	37.0	2.4	1.2
2	37.0	0.6	0.4
3	45.0	0.6	0.6
4	37.0	1.5	0.7
5	37.0	1.5	0.7
6	29.0	1.5	0.6
7	29.0	2.4	0.8
8	37.0	1.5	0.7
9	45.0	1.5	0.7
10	29.0	0.6	0.3
11	37.0	1.5	0.7
12	45.0	2.4	1.0
13	37.0	1.5	0.7
14	45.0	2.4	1.6
15	45.0	2.4	1.6
16	45.0	2.4	1.4
17	45.0	2.4	0.9

En la Tabla 17, se muestran los valores de productividad obtenidos mediante la experimentación.

El análisis de varianza de la variable de respuesta permitió diagnosticar si los modelos que fueron sugeridos estadísticamente sirven para encontrar niveles óptimos de productividad de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei*. Lo cual se efectuó mediante la optimización (maximización) de dicha variable utilizando la función de deseabilidad.

En la Tabla 18 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del modelo sugerido, este análisis de varianza de la variable de respuesta permitió conocer si el nuevo modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo que nos permita obtener la mayor productividad total de ácido láctico.

En el ANOVA del modelo estimado para la productividad de ácido láctico en la tabla 15, muestra que valores de  $p < 0.0500$  son los términos significativos del modelo. Al analizar la productividad de ácido láctico, muestra que los términos del efecto lineal de la temperatura (A) y el de dilución (B) fueron significativos. Demostrando que estos modelos pueden ser utilizados para encontrar la optimización de los parámetros óptimos del bioproceso (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

**Tabla 18.** ANOVA para el modelo de primer orden de la productividad de ácido láctico.

Fuente	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medio	Valor F	Valor - p
Modelo	2	1.6700	0.8344	21.2600	<0.0001
A – T	1	0.2048	0.2048	5.2200	0.0385
B – D	1	0.9724	0.9724	24.7700	0.0002
Residual	14	0.5495	0.0393		
Falta de Aj.	6	0.0919	0.0153	0.2678	0.9371
Error Puro	8	0.4576	0.0572		
Correl Total	16	2.2200			
R <sup>2</sup>		0.7523			
R <sup>2</sup> Ajustado		0.7169			
C.V. %		22.8500			
Prec. Adec		12.2032			

A demás, en referencia al coeficiente de determinación R<sup>2</sup> predicho de 0.6381 está en un acuerdo razonable con el R<sup>2</sup> ajustado de 0.7169; es decir, la diferencia es menor que 0.2, muestra que el modelo usado para la optimización de los parámetros es satisfactorio. Por lo que mediante (Gutiérrez y De la Vara, 2012), se puede tomar en cuenta estos modelos debido a que para fines de predicción un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) debe ser por lo menos 0.7.

#### **4.2.4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO SUGERIDO PARA LA MAXIMIZACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE ÁCIDO LÁCTICO**

Una vez analizado el ANOVA del modelo sugerido se procedió a encontrar el punto óptimo para lo cual el paquete estadístico nos sugirió cinco combinaciones de los niveles de los factores que cumplen con las condiciones óptimas, se escogió

uno de ellos para realizar la validación del modelo, tal como se describe en la tabla 19.

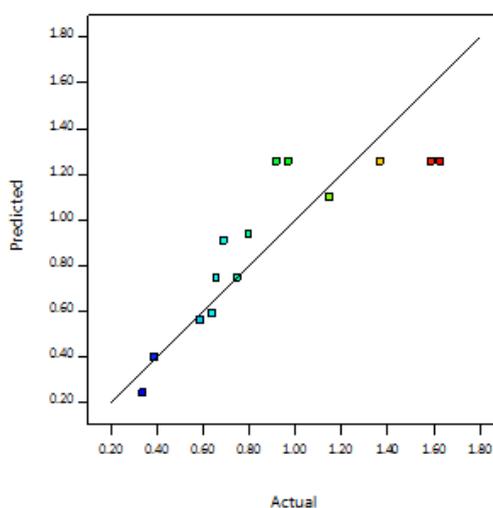
**Tabla 19.** Condiciones óptimas para la maximización de productividad total de ácido láctico según el modelo sugerido.

Número	Temp. Ópt. (T*) (°C)	Dilución. Ópt. (D*) (h <sup>-1</sup> )	Productividad Máx. Ácido láctico (g/h)
1	45.00	2.40	1.26
2	45.00	2.37	1.24
3	44.13	2.40	1.24
4	45.00	2.36	1.24
5	45.00	2.33	1.23

Para validar el modelo sugerido, se realizaron tres experimentos similares, en el punto óptimo seleccionado de (45°C y 2.4 h<sup>-1</sup>).

Además, otros autores reportaron una temperatura óptima en el proceso de fermentación en un rango de 30- 45°C (Panesar et al., 2010). Mientras que otros autores reportan que a valores extremos de temperatura de 55°C probados redujeron la formación del producto (Tuli et al., 1985).

Una vez obtenidos los valores predichos que arroja el modelo para la variable de respuesta de productividad total, se realizó una comparación entre los valores reales y predichos según la figura 10.



**Figura 10.** Valores predichos vs valores reales de productividad total.

Los resultados obtenidos tras la experimentación confirmaron la precisión del modelo lineal para la maximización de la productividad total de ácido láctico, ya que la media no presentó diferencia significativa entre los valores predichos y los valores reales, tal como se describe en la tabla 16.

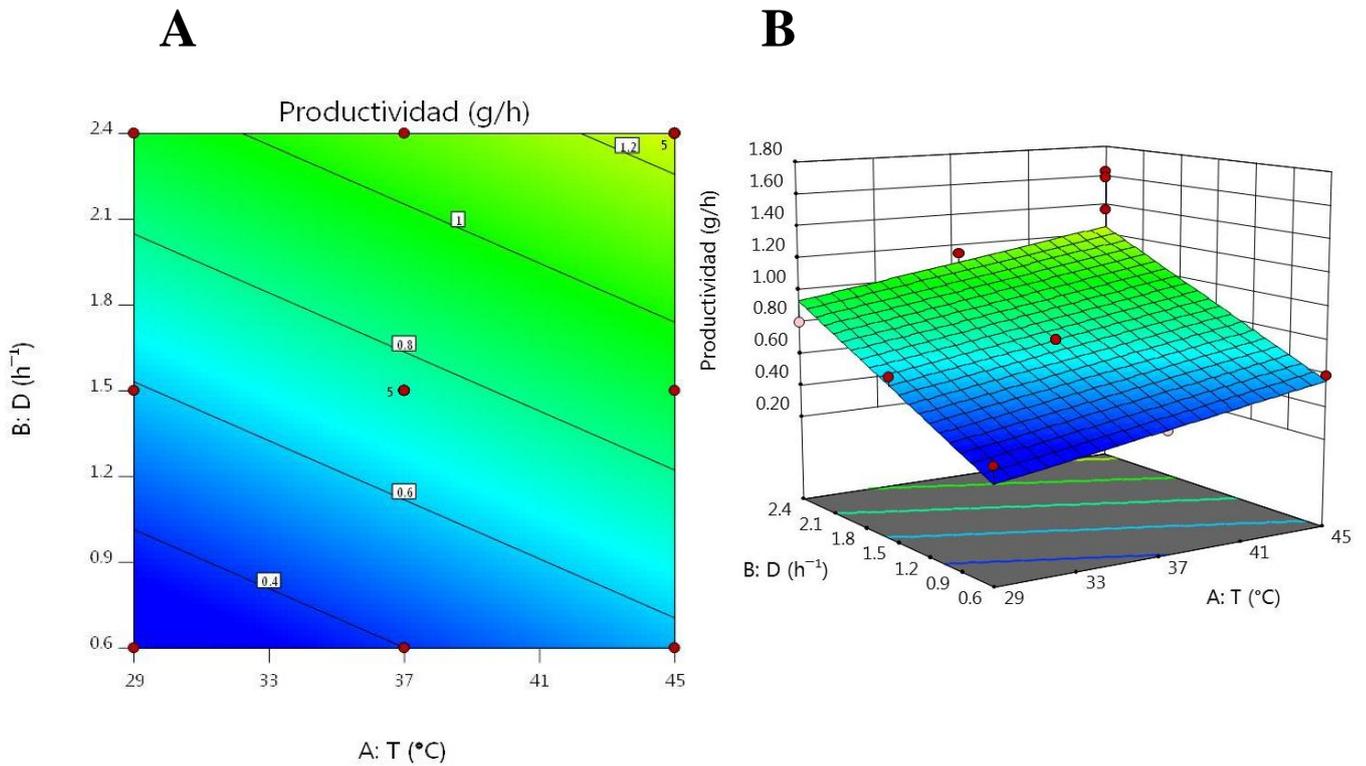
**Tabla 20.** Condición óptima predicha y real para la maximización de la productividad de ácido láctico.

Respuesta	Media Predicha	Desv. Est.	95% IP Bajo	Media Real	95% IP Alto
Productividad (g/h)	1.26	0.20	0.96	1.36	1.55

La gráfica en 3D del modelo usado, muestra que mediante la combinación de los factores temperatura y dilución se puede explorar para encontrar los parámetros óptimos de productividad total de ácido láctico (AP).

#### 4.2.5. REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LA VARIABLE DE RESPUESTA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE PRODUCTIVIDAD DE ÁCIDO LÁCTICO

En la figura 11, se muestra el valor óptimo escogido para la maximización de la productividad total de ácido láctico que fue obtenido de las variables independientes sugeridas por el programa de cómputo. Para la exploración de la productividad volumétrica máxima de ácido láctico se estima valores de  $6.9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  la cual es superior al comparar con los resultados de otra investigación realizada por Göksungur, Gündüz y Harsa (2005) que obtuvieron una concentración de  $2.78 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 11.** A) Plot de Contorno del punto óptimo de la maximización de la productividad total de ácido láctico; B) Representación gráfica 3D del punto óptimo para la maximización de la productividad total de ácido láctico.

El comportamiento de la productividad de ácido láctico en relación a los factores en estudio, lo cual se puede comprobar que existe una máxima productividad a valores de temperatura de  $45^{\circ}C$  y el factor de dilución  $2.4 h^{-1}$ .

La productividad de ácido láctico varía según la influencia de la temperatura, flujo de alimentación o factor de dilución. En la tabla 21 se muestra la productividad total frente a la productividad volumétrica.

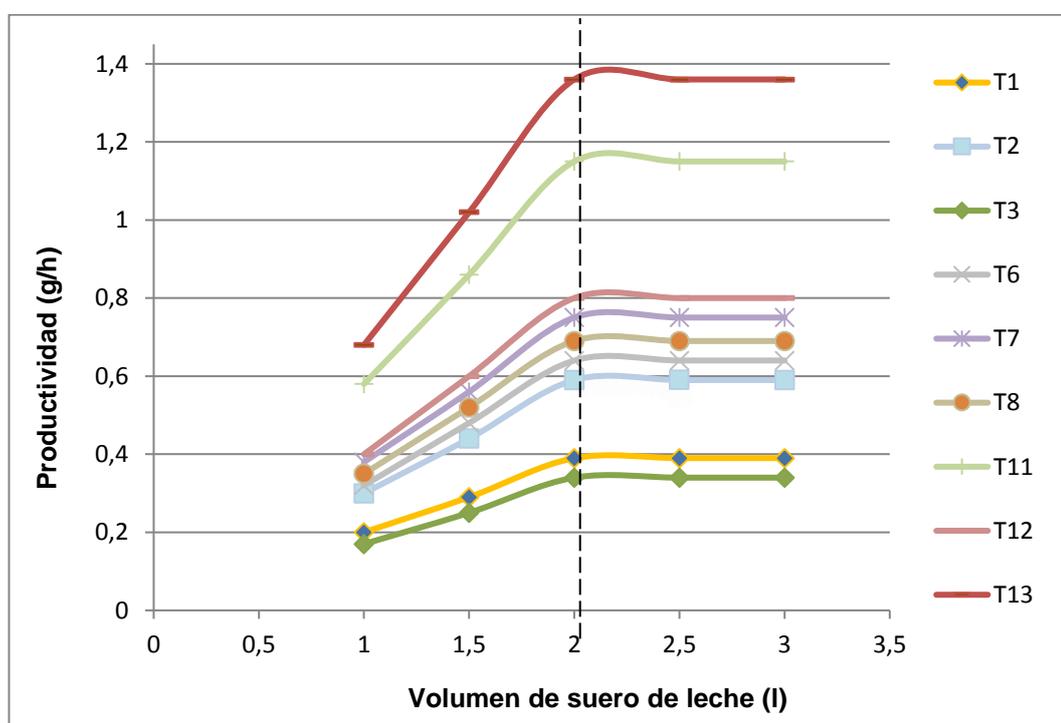
**Tabla 21.** Resultados alcanzados de productividad total frente a productividad volumétrica según valores de las variables en estudio.

Nº	Temperatura (°C)	Factor de dilución (h <sup>-1</sup> )	Productividad total (g/h)	Productividad volumétrica (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	37.0	2.4	1.2	5.8
2	37.0	0.6	0.4	1.9
3	45.0	0.6	0.6	2.9
4	37.0	1.5	0.7	3.7
5	37.0	1.5	0.7	3.7
6	29.0	1.5	0.6	3.8
7	29.0	2.4	0.8	3.9
8	37.0	1.5	0.7	3.3
9	45.0	1.5	0.7	3.5
10	29.0	0.6	0.3	1.7
11	37.0	1.5	0.7	3.7
12	<b>45.0</b>	<b>2.4</b>	<b>1.0</b>	<b>4.9</b>
13	37.0	1.5	0.7	3.7
14	45.0	2.4	1.6	8.2
15	45.0	2.4	1.6	7.9
16	45.0	2.4	1.4	6.9
17	45.0	2.4	0.9	4.6

La investigación realizada de optimización de la temperatura y factor de dilución mostró una influencia significativa a 45°C y 2.4 h<sup>-1</sup> en la productividad de ácido láctico por células inmovilizadas en un proceso de fermentación continuo; sin embargo, los valores de productividad obtenidos por Tuli et al., (1985) fueron menores, esto puede ser influenciado por el modo de operación empleado por los autores, que fue un proceso de fermentación discontinuo.

### 4.3. REALIZAR UN ESTUDIO CINÉTICO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Para comprobar que el bioproceso se encontraba en estado estacionario se realizó una cinética de producción de ácido láctico, tomando en cuenta cada uno de los tratamientos que se encuentran en la tabla 12. Los resultados gráficos se muestran en figura 12.



**Figura 12.** Cinética de producción de ácido láctico

Los resultados alcanzados demuestran que en todos los tratamientos una vez pasado 2 litros de lactosuero equivalente a 10 volúmenes de perlas (0.2 l) y manteniendo constantes las variables en estudio con los valores de cada tratamiento, se logra un estado estacionario para cada una de las combinaciones, comprobando lo descrito por Mirdamadi et al., (2008). El mayor valor de productividad volumétrica fue alcanzando por el tratamiento T13 es de  $6.9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , después de lograr el estado estacionario.

En la tabla 22 se reportan valores de productividad y diferentes condiciones de cultivo, que se consideraron adecuados para la producción de ácido láctico en este y otros estudios. La productividad volumétrica de ácido láctico en este estudio fue de  $6.9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  siendo menor a los estudios realizados por Bruno, Ragout, Cordoba y Sineriz (2000) que obtienen valores de  $9.72 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Las posibles causas de estos resultados podrían deberse a las diferentes condiciones de fermentación, pero el inconveniente que podría tener esto es que el modo de fermentación en cascada empleado resulta de difícil aplicación a escala industrial. Y con el resto de los autores las causas también podrían deberse al empleo de diferentes colecciones de cepas del *Lactobacillus casei* así como los valores de temperatura utilizados.

**Tabla 22.** Productividad de ácido láctico a diferentes condiciones de cultivo.

Sustrato	Microorganismo	Suplementos	Condiciones de fermentación	Productividad volumétrica	Tipo de fermentación	Autor
Lactosa	<i>Lactobacillus casei</i> - 01	-	45° C/ pH 6.8 2.4 h <sup>-1</sup> inmovilización	6.9 gl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	En continuo, lecho empacado	Este estudio
Glucosa	<i>Lactobacillus casei</i>	Extracto de levadura (5 g l <sup>-1</sup> )	45° C/ pH 5,5	9.72 g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Continuo	Bruno, Ragout, Cordoba y Sineriz (2000).
Glucosa	<i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>casei</i> ATCC 39392	-	42° C/ pH 4.8-5 inmovilización	0.625 gl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Discontinuo	Mirdamadi et al. (2008)
Lactosa	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	Extracto de levadura (28.8 g l <sup>-1</sup> )	37° C inmovilización	2.78 gl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Discontinuo	Göksungur, Gündüz y Harsa (2005)

#### 4.4. CARACTERIZAR EL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO EN EL PROCESO

El ácido láctico obtenido de la mejor combinación de los parámetros del proceso: flujo de alimentación 480 ml/h ( $D = 2.4 \text{ h}^{-1}$ ) y temperatura 45°C, se sometió a un proceso de evaporación; después de mantener el volumen constante se midieron las variables que se presentan en la tabla 23.

**Tabla 23.** Características físico-químicos del ácido láctico obtenido.

Característica	Descripción
Aspecto	Amarillo rojizo
Densidad a 20°C	1.1 g/ml
Lactosa	1.88
Solubilidad en agua a 20°C	Soluble
pH	3.1 (s.u.)

s. u.: sin unidades

El producto de ácido láctico obtenido después de un proceso de concentración por evaporación se pudiera comparar con las características de un ácido láctico comercial del 80%, en caso de la densidad el valor es 1.1 g/ml no cumple con lo que dice Pintaluba (2012), estas características podrían mejorarse con la aplicación de técnicas de purificación como ultrafiltración y mejores condiciones en el proceso de evaporación.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

Los análisis físico-químicos del suero de leche demostraron que los valores de grasa 0.35, proteína 0.46, lactosa 2.08, acidez titulable 0.07 y pH 6.8 se encontraron dentro de los rangos establecidos en la Normativa Técnica Ecuatoriana de suero de leche líquido NTE INEN 2594: 2011.

Con la técnica de inmovilización del *Lactobacillus casei* se logró una productividad volumétrica de ácido láctico promedio de  $6.9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  encontrándose dentro del rango de valores predichos por el modelo lineal. La maximización de la productividad se logra a un flujo de alimentación de 480 ml/h ( $D = 2.4 \text{ h}^{-1}$ ) y temperatura de 45°C en las condiciones de fermentación.

La cinética de productividad de ácido láctico, demostró que se logra el estado estacionario del bioproceso, al pasar 10 volúmenes de suero equivalentes al volumen de perlas, estabilizando los valores de productividad en cada tratamiento aplicado.

El ácido láctico obtenido presentó características cercanas a las del ácido láctico comercial, con valores de densidad 1.1 g/ml y color amarillo rojizo, según Pintaluba (2012).

#### **5.2. RECOMENDACIONES**

- Estudios cinéticos del *Lactobacillus casei* con la adición de suplementos al suero de leche.
- Aplicar métodos de purificación para mejorar la calidad del ácido láctico.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aditivos Alimentarios*. (2017). Ácido láctico. Obtenido de <http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e270-acido-lactico.html>
- Aider, M., Halleux, D., & Melnikova, I. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), 334-341.
- Almeida, K., Tamime, A., & Oliveira, M. (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*, 42, 672-678.
- Alsaheb, R., Aladdin, A., Othman, N., Malek, R., Leng, O., Aziz, R., & Enshasy, H. (2015). Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10), 729-735.
- Arellano, A. (2013). *Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana* (tesis de pregrado). Universidad autónoma de Querétaro, Querétaro.
- Banco Central del Ecuador. (2017). *Sistema de Información Nacional SINAGAP*. Obtenido de <http://sinagap.magap.gob.ec/Sina/paginasCGSIN/VisorReporte.aspx>
- Boyaval, P., & Goulet, J. (1988). Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Butterworth Publishers*, 10(12), 725-728.
- Bruno, J., Ragout, A., Cordoba, P., & Sineriz, F. (2000). Continuous production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus casei* in twostage systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3), 316-324.

- Castillo, F., Balciunas, E., Salgado, J., Dominguez, J., & Converti, A. (2013). Lactic acid properties, application and production. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70-83.
- Cruz, K. (2007). *Inmovilización de Lactobacillus delbrueckii como vector probiótico*. Mexico: Instituto politécnico nacional unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología .
- Díaz, M. (2015). Biorreactor continuo de flujo pistón (BCFP). En M. Díaz, *Ingeniería de Bioprocesos* (págs. 360-397). Madrid: Paraninfo.
- Dairyforall. (2013). Dairyforall. Recuperado el 24 de Mayo de 2017, de <http://www.dairyforall.com/whey.php>
- Dominguez, F. (2015). *Inmovilización de células*. Lima- Perú: Universidad de Granada.
- Efremenko, E., Spiricheva, O., Veremeenko, D., Baibak, A., & Lozinsky, V. (2006). L(+)-Lactic acid production using poly (vinyl alcohol)-cryogel-entrapped *Rhizopus oryzae* fungal cells. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(4), 519–522.
- Egan, A. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 327–336.
- Engineers, N. B. (2011). *Handbook on Fermented Foods and Chemicals*. ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc.
- Fernández, L., & del Castillo, M. (2007). *Lactobacillus casei* . En L. Fernández, & M. del Castillo, *Lactobacillus spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora* (págs. 4-8). Habana: Editorial Universitaria.
- Fuertes, R., Rodriguez, L., & Monteagudo. (2004). Behaviour of different *Lactobacillus* species in the production of lactic acid by the fermentation of whey. *Acta Biotechnologica*, 15(1), 67.
- Galarza, L. (2012). Bacterias ácido lácticas. En L. Galarza, Aislamiento y selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de

- abejas (págs. 14-17). Bogotá, Colombia : Universidad Nacional de Colombia.
- García, C., Paternina, G., & Villadiego, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnología . *Temas agrarios*, 15(2), 9–26.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra . (14 de Junio de 2017). *Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra* . Obtenido de <https://www.ibarra.gob.ec/>
- Göksungur, Y., Gündüz, M., & Harsa, S. (2005). Optimization of lactic acid production from whey by *L casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80(11), 1282-1290.
- Gutiérrez, H. (2014). Productividad. En H. Gutiérrez, *Calidad y productividad* (págs. 20-22). Guadalajara: Mc Graw Hill Education .
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2012). Metodología de superficie de respuesta. En H. Gutiérrez, & R. De la Vara, *Análisis y diseño de experimentos* (págs. 345-373). México: McGraw-Hill.
- INEC. (2018). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2018. Recuperado de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2018/Boletin%20tecnico.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Boletin%20tecnico.pdf)
- INEN. (2011). Suero de leche liquido. Requisitos. Recuperado de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2594.2011.pdf>
- Jarrett, T. (2012). Acids in confections. *Manuf. Confectioner*, 1, 58–63.
- Jelen, P. (2003). Whey processing. Utilization and products. En P. Jelen, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (págs. 2739-2745). London: Academic Press.
- KGaA, M. (2013). Reactivos y productos químicos. Darmstadt: Frankfurter Strasse.

- Latif, A., & Masud, T. (2006). Use of natural preservative in bread making. *American Journal of Food Technology*, 1(1), 34-42.
- Linko, P. (1980). The entrapment of cells in calcium alginate gel beads. *Food Process Eng*, 3(4), 27-39.
- Liu, X., Chung, K., Yang, S., & Yousef, A. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry*, 40, 13-24.
- Madrid, A. (2016). Queso camembert. En A. Madrid, *Ingeniería y producción de alimentos* (págs. 150-151). Madrid: AMV EDICIONES.
- Mirdamadi, S., Atashgahi, S., Rajabi, A., Aziz, F., Roayaei, M., & Hamed, J. (2008). Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production. *Iranian Journal Of Biotechnology*, 6(1), 16-21.
- Morganti, P. (1996). Alpha hydroxy acids in cosmetic dermatology. *Journal of Applied Cosmetology*, 14(2), 35-41.
- Muñi, A., Paez, G., Faría, J., Ferrer, J., & Ramones, E. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica*, 15, 361-367.
- Orozco, M. (2015). Un tercio de la producción láctea se dedica al queso. Recuperado de <http://www.revistalideres.ec/lideres/ecuador-produccion-lactea-queso.html>
- Panesar, P., Kennedy, J., Knill, C., & Kosseva, M. (2010). Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 223-225.
- Panesso, G., Pardo, M., & Sepúlveda, L. (2015). Producción de ácido láctico a partir del suero de leche. *Temas agrarios*, 15(2), 9-26.
- Parra, R. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967-4982.

- Parra, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Pescuma, M., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6183–6196.
- Pintaluba, A. (2012). *Pintaluba*. Características del ácido láctico. Obtenido de [http://www.pintaluba.com/2012/pintaluba/ftp/340\\_20131021015418.pdf](http://www.pintaluba.com/2012/pintaluba/ftp/340_20131021015418.pdf)
- Recinos, A., & Saz, O. (2006). *Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en el Salvador* (tesis de pregrado). Universidad del Salvador, Salvador.
- Rojas, A., Montaña, L., & Bastidas, M. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5-10.
- Roldána, M., Oterob, J., Villarreal, F., Baronia, M., Carrascoc, M., Álvarez, C., & Simonettac, A. (2011). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157: H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(1), 37-41.
- Sortwell, D. (2004). Acidulants for Confectionery. *The Tart of Good Taste*, 1(1), 58-60.
- Tuli, A., Sethi, P., Khanna, K., & Marwaha, S. (1985). Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(4), 164-168.
- Vijayakumar, J., Aravindan, R., & Viruthagiri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(2), 245–264.
- Villatoro, G. (2006). *Estudio de factibilidad para la producción de ácido comercial, a nivel industrial en Guatemala* (tesis de pregrado). Universidad de San Carlos, Guatemala.

- Ward, O. (1991). Sistemas de fermentación. *Biotecnología de la fermentación principios, procesos y productos* (págs. 47-49). Zaragoza: Acribia.
- Yang, S., El Enshasy, H., & Thongchul, N. (2013). Lactic Acid. En S. Yang, H. El Enshasy, & N. Thongchul, *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers* (págs. 293-295). Bangkok: WILEY.