



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD INGENIERÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**“OPTIMIZACIÓN ESTADÍSTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO  
LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO POR *Lactobacillus casei*”**

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

**Autora: FLORES TIXICURO JESSICA MARIBEL**

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

**Ibarra-Ecuador**

**2020**



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:	100383703-4		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Flores Tixicuro Jessica Maribel		
DIRECCIÓN:	Comunidad de Guananci-Otavalo		
EMAIL:	jmflorest@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0968151837

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	"OPTIMIZACIÓN ESTADÍSTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO POR <i>Lactobacillus casei</i> "
AUTOR (ES):	Flores Tixicuro Jessica Maribel
FECHA: DD/MM/AAAA	24/11/2020
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 Núñez Pérez, MSc.

2. CONSTANCIAS

La autora 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 la 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 24 días del mes de noviembre de 2020

EL AUTOR:

(Firma).....

Nombre: Flores Tixicuro Jessica Maribel

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Jessica Maribel Flores Tixicuro, con cédula de ciudadanía 1003837034, bajo mi supervisión.



---

Ing. Jimmy Núñez Pérez, MSc.  
**DIRECTOR DE TESIS**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por ser mi mayor fortaleza y permitir culminar una meta más en mi vida.

A mis padres Carmela y Luis por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por sus consejos, enseñanzas y cuidados, son mi orgullo y motivación, a mis hermanos por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, todos ustedes son la razón de mi existir.

A Sairi, por estar a mi lado inclusive en los momentos más tormentosos y difíciles de mi vida brindándome su total apoyo. No fue sencillo culminar con este proyecto, sin embargo, siempre fuiste muy positivo y motivador, me ayudaste hasta donde te fue posible, incluso más allá.

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.

## **DEDICATORIA**

Este logro se lo dedico a mis padres quienes lucharon por mí día a día a pesar de la falta de oportunidades y en especial a mi amada madre por ser un ejemplo de mujer, fuiste y eres quien forjó en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación, por tu gran corazón y hermosos sentimientos te admiro cada día más.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	9
SUMMARY .....	10
CAPÍTULO I.....	11
INTRODUCCIÓN .....	11
1.1 Problema.....	11
1.2 Antecedentes .....	12
1.3 Justificación.....	14
1.4 Objetivos .....	15
1.5 Hipótesis.....	15
CAPÍTULO II .....	16
MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 Lactosuero .....	16
2.2 Ácido láctico.....	18
2.2.1 Propiedades del ácido láctico .....	19
2.2.2 Usos del ácido láctico .....	20
2.3 Determinación del ácido láctico .....	22
2.3.1 Método espectrofotométrico.....	22
2.3.1.1 Determinación de ácido láctico de un medio líquido .....	22
2.3.2 Acidez titulable.....	22
2.4 Bacterias ácido lácticas .....	22
2.5.1 Requerimiento energético y no energético .....	24
2.5.2 Condiciones que debe cumplir un medio de cultivo .....	25

2.5.3 Agar y caldo mrs .....	26
2.6 Crecimiento microbiano .....	27
2.6.1 Fases del crecimiento .....	28
2.7 Sistema de banco de células .....	30
2.8 Fermentación ácido láctica .....	31
2.9 Bioproceso de obtención de ácido láctico .....	32
2.10 Biorreactor .....	33
2.10.1 Biorreactor discontinuo de tanque agitado .....	34
CAPÍTULO III .....	36
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
3.1 Caracterización del área de estudio .....	36
3.1.1 Localización del experimento.....	36
3.2 Materiales y equipos.....	36
3.2.1 Materia prima e insumos .....	36
3.2.2 Materiales .....	37
3.2.3 Equipos .....	38
3.3 Metodología.....	39
3.3.1 Caracterización del lactosuero mediante análisis físico-químicos .....	39
3.3.2 Determinación de la combinación de temperatura y ph que maximice la productividad volumétrica de ácido láctico. ....	41
3.3.3 Caracterización del ácido láctico obtenido mediante análisis físico- químicos.....	45
3.3.4 Manejo específico del experimento.....	49
CAPÍTULO IV .....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
4.1 Caracterización del lactosuero mediante análisis físico-químico.....	55

4.2 Determinación de la combinación de temperatura y ph que maximice la productividad volumétrica de ácido láctico.....	56
4.3 Caracterización del ácido láctico obtenido mediante análisis físico químicos .....	67
CAPÍTULO V .....	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
5.1 Conclusiones .....	70
5.2 Recomendaciones .....	71
6. BIBLIOGRAFÍA .....	72



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Requisitos físico-químicos de lactosuero de leche líquido .....	17
<b>Tabla 2.</b> Propiedades físico-químicos del ácido láctico al 88 % .....	19
<b>Tabla 3.</b> Usos de ácido láctico según su pureza .....	21
<b>Tabla 4.</b> Bacterias ácido lácticas productoras de ácido láctico .....	276
<b>Tabla 5.</b> Contenido de agar MRS .....	27
<b>Tabla 6.</b> Ubicación del área de trabajo .....	36
<b>Tabla 7.</b> Análisis físico-químicos de lactosuero.....	39
<b>Tabla 8.</b> Factores en estudio: temperatura y pH.....	42
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos para la producción de ácido láctico.....	43
<b>Tabla 10.</b> Análisis físico-químicos del ácido láctico obtenido.....	45
<b>Tabla 11.</b> Datos para la construcción de la curva de calibración .....	46
<b>Tabla 12.</b> Resultado de la caracterización de lactosuero.....	55
<b>Tabla 13.</b> Resultados obtenidos del bioproceso .....	60
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza del modelo cuadrático.....	63
<b>Tabla 15.</b> Condiciones óptimas para la productividad volumétrica de ácido láctico .....	64
<b>Tabla 16.</b> Repeticiones del experimento con condiciones óptimas.....	64
<b>Tabla 17.</b> Puntos predichos de productividad máxima con 95 % de Confianza ...	65
<b>Tabla 18.</b> Comparación de Productividad volumétrica de ácido láctico con otros estudios en cultivos por lotes .....	66
<b>Tabla 19.</b> Características físico-químicos del ácido láctico obtenido .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Curva de crecimiento en un sistema discontinuo .....	28
<b>Figura 2.</b> Conversión de glucosa por bacteria ácido lácticas .....	32
<b>Figura 3.</b> Esquema de biorreactor discontinuo de tanque agitado .....	34
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica de los tratamientos .....	43
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración para la determinación de ácido láctico .....	47
<b>Figura 6.</b> Unidades de color Hazen (UPC) .....	48
<b>Figura 7.</b> Diagrama de bloques para la producción de ácido láctico .....	49
<b>Figura 8.</b> Banco de células de trabajo .....	51
<b>Figura 9.</b> Biorreactor discontinuo .....	52
<b>Figura 10.</b> Adición de ácido sulfúrico.....	53
<b>Figura 11.</b> Sulfato de calcio formado.....	54
<b>Figura 12.</b> Ácido láctico formado .....	54
<b>Figura 13.</b> Activación de <i>L. casei</i> : .....	57
<b>Figura 14.</b> Recuperación de Biomasa .....	57
<b>Figura 15.</b> Bioproceso utilizado en la obtención de ácido láctico. ....	58
<b>Figura 16.</b> Cinética de la productividad de ácido láctico .....	59
<b>Figura 17.</b> Diagrama de proceso para la obtención de punto óptimo para la productividad de ácido láctico. ....	61
<b>Figura 18.</b> Representación del punto óptimo en a) 2D y b) 3D .....	65
<b>Figura 19.</b> Ácido láctico obtenido.....	68
<b>Figura 20.</b> Métodos utilizados para la medición de concentración de ácido láctico .....	68

## RESUMEN

El lactosuero es el principal subproducto de la industria quesera, contiene aproximadamente el 55 % de nutrientes, por lo tanto, su alto potencial como materia prima lo hace ideal para el desarrollo de nuevos e innovadores productos con valor agregado. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue darle uso a este sustrato y producir ácido láctico mediante el proceso de la fermentación con *Lactobacillus casei*, que son bacterias ácido lácticas que metabolizan la lactosa y producen ácido láctico como producto principal. El desarrollo del experimento inició con la caracterización de lactosuero mediante análisis fisicoquímicos. Se evaluaron las variables de temperatura en los valores de (29, 31.1, 37, 42.7 y 45 °C) y pH (4.8, 5, 5.5, 6 y 6.2) para encontrar parámetros óptimos de fermentación que maximicen la productividad volumétrica en la producción de ácido láctico mediante el uso del Diseño Central Compuesto utilizando el programa estadístico *Design Expert 11.0*. Se realizaron trece corridas experimentales. Se verificó la validez del modelo cuadrático mediante 3 repeticiones con los parámetros óptimos sugeridos por el programa y se determinó que las condiciones que permiten la maximización de la productividad volumétrica son 40.2 °C de temperatura y 5.6 de pH, alcanzando valores de 1.2 g/l·h y se confirmó que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con los valores brindados por el modelo. Concluyendo que los valores óptimos de temperatura y pH encontrados fueron cercanos a los reportados por otros autores y se demostró que el lactosuero tiene un gran potencial para ser utilizado como sustrato en la obtención de ácido láctico a partir de bacterias ácido lácticas como el *L. casei*.

**Palabras clave:** lactosuero, fermentación, *L. casei*, diseño central compuesto, sustrato.

## SUMMARY

Whey is the main by-product of the cheese industry, it contains approximately 55% of nutrients, so its high potential as raw material, it is ideal for the development of new and innovate products with added value. For this reason, the objective of this work was to use this substrate and produce lactic acid through fermentation process with *Lactobacillus casei*, lactic acid bacteria that metabolize the lactose and produce lactic acid as the main product. The development of the experiment began with the characterization of whey through physico-chemical analysis. The variables of temperature (29, 31.1, 37, 42.7 y 45 °C) and the pH (4.8, 5, 5.5, 6 y 6.2) were taken to find optimal fermentation parameters that maximize volumetric productivity in the production of lactic acid by use composite central design using the Design Expert 11.0. Thirteen experimental runs were performed. The validity of the quadratic model was verified through 3 repetitions with the optimal parameters indicated by the program, with which it was determined that the conditions that allow the maximization of volumetric productivity are 40.2 °C of temperature and 5.6 of pH, reaching values close to 1.2 g/l·h. and it was confirmed that there is no significant difference ( $p \leq 0.05$ ) with the values provided by the model. Concluding that the optimal values of temperature and pH found were close to those reported by other authors and it was shown that whey has great potential to be used as a substrate in obtaining lactic acid from lactic acid bacteria such as *L. casei*.

**Key words:** whey, fermentation, *L. casei*, central composite design, substrate.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 PROBLEMA

La leche ha sido materia prima para crear diferentes productos derivados desde hace mucho tiempo, sus características organolépticas, nutricionales, físico-químicas y funcionales la hacen el elemento base favorito para la industria láctea.

La industria láctea se ha desarrollado, en gran medida, los últimos años creando nuevos productos e innovándolos también, como resultado de esta productividad se obtienen subproductos en cantidades importantes como es el caso del lactosuero. De acuerdo al Instituto de Tecnología Industrial (INTI de Argentina) citado por el Centro de la Industria Láctea (CIL, 2019) “el lactosuero representa cerca del 90 % del volumen de leche y contiene aproximadamente el 55 % de nutrientes. Entre los más abundantes se encuentran: lactosa (45-50 g/l), proteínas solubles (6 – 8 g/l), lípidos (4 – 5 g/l) y sales minerales (4 – 6 g/l)” (p.1).

De acuerdo a CIL (2019) a nivel nacional se producen 5 032 729 l/d de leche cruda, de los cuales 2 516 365 l/d se utilizan para el procesamiento formal y cuyo 32 % está destinado a la producción de queso, resultando en 724 713 l/d de lactosuero. La industria utiliza 60 393 l/d de lactosuero para la elaboración de bebidas lácteas. La producción de suero disponible y no utilizado es de 664 320 l/d.

La deficiente investigación sobre procesos alternativos aplicables al uso de este subproducto y el alto costo que implica el tratamiento en plantas de aguas residuales, representan unas de las problemáticas más significativas para la industria láctea.

## 1.2 ANTECEDENTES

Buyukkileci y Harsa (2004) investigaron los efectos de temperatura, pH y composición del medio en la producción de ácido láctico por *Lactobacillus casei*. Para este estudio utilizaron *L. casei* NRRL B-441 y lactosuero con contenido de lactosa del 60-62 % (m/m), posteriormente disuelta para alcanzar la concentración inicial deseada. El lactosuero se suplementó con 10 g/l de extracto de levadura,  $K_2HPO_4$  (0.5 g/l),  $KH_2PO_4$  (0.5 g/l),  $MgSO_4$  (0.2 g/l) y  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0.2 g/l).

El *Lactobacillus casei* se cultivó a cinco diferentes temperaturas (27, 32, 37, 42 y 47 °C) durante tres generaciones sucesivas en leche tornasol. El crecimiento del cultivo fue determinado por el cambio de color; a temperaturas de 32 y 37 °C el color cambió en el primer día, mientras que a 27 y 42 °C el cambio de color se evidenció al segundo día y finalmente a 47 °C el crecimiento fue demasiado bajo. En cuanto a la producción de ácido láctico, el más rápido fue a 37 °C con una productividad volumétrica total de 1.87 g/l·h, el efecto de las temperaturas no fue significativo entre 32 y 42 °C, por lo tanto, la velocidad de producción de ácido láctico fue muy similar a estas temperaturas. A 27°C, el proceso de fermentación duró 45 h y la formación de producto fue bastante lenta (Buyukkileci y Harsa, 2004).

Estos resultados confirmaron lo que Hujanen y Linko (1996) citados por Buyukkileci y Harsa (2004) encontraron que la mejor temperatura de producción para *Lactobacillus casei* NRRL B-441 fue de 37°C donde se obtuvo 80 g/l de ácido láctico en 24 h a partir de 90 g/l usando altas concentraciones de extracto de levadura e inóculos de 2.2 % y 20 %, respectivamente.

Buyukkileci y Harsa (2004) exploraron estudios sobre el mejor pH, con valores de 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 para *L. casei* en el fermentador. Los valores de niveles de pH se mantuvieron mediante la adición automática de 10 mol/l (M) de NaOH. Como máximo, se añadieron 200 ml de NaOH a 3 l de medio de fermentación para mantener el pH, por lo que el volumen de fermentación aumentó no más del 6.6 %. Se utilizó

toda la lactosa en todas las fermentaciones y los valores de rendimiento del producto fueron de aproximadamente 93 g de ácido láctico por g de lactosa. La lactosa fue consumida por completo a pH 5.0 que se logró en 23 h. A otros valores de pH se obtuvieron tendencias similares, pero dentro de las 12 h, aunque no se observó una diferencia significativa en la productividad volumétrica para los valores de pH entre 5.5 y 6.5, sin embargo, el valor de productividad volumétrica más alto se obtuvo a pH de 5.5 y fue de 3.97 g/l·h.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

En el 2016 Ecuador realizó una importación de 77.38 toneladas métricas de ácido láctico lo que representa un monto de 151 000 dólares; a mediados del 2017 el país importó 27.46 toneladas métricas de este compuesto lo que representa 47 110 dólares (Banco Central del Ecuador, 2017).

El lactosuero de queso contiene aproximadamente 5% (m/v) de lactosa, 1% de proteínas, 0.4% de grasa, y algunos minerales (Buyukkileci y Harsa, 2004) que puede ser aprovechado para la obtención de ácido láctico mediante la fermentación con bacterias ácido lácticas, utilizando aproximadamente el 50% de los nutrientes del lactosuero. Al dar valor agregado a este subproducto se generarán ingresos económicos a las industrias lácteas y de ser rentable, se podrá desarrollar a futuro la tecnología a escala piloto y posteriormente industrial con miras a disminuir las importaciones de esta materia prima provocando el ahorro de miles de dólares, considerando que el ácido láctico es ampliamente utilizado en la industria de la alimentación, química, textil, farmacéutica y otras.

La presente investigación tiene como alcance la utilización de la lactosa disuelta en el lactosuero mediante el uso de *Lactobacillus casei* en el establecimiento de parámetros óptimos de proceso para la obtención de ácido láctico.



## 1.4 OBJETIVOS

### Objetivo General

Optimizar estadísticamente la productividad de ácido láctico a partir de lactosuero por *Lactobacillus casei*.

### Objetivos específicos

- Caracterizar el lactosuero mediante análisis físico-químicos.
- Determinar la combinación de temperatura y pH que maximice la productividad de ácido láctico.
- Caracterizar el ácido láctico obtenido mediante análisis físico-químicos.

## 1.5 HIPÓTESIS

**Ho:** Los parámetros cinéticos temperatura y el pH no influyen sobre la productividad volumétrica de ácido láctico con *Lactobacillus casei* a partir de la fermentación del lactosuero dulce.

**Ha:** Los parámetros cinéticos temperatura y el pH influyen sobre la productividad volumétrica de ácido láctico con *Lactobacillus casei* a partir de la fermentación del lactosuero dulce.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 LACTOSUERO

El lactosuero es un subproducto de la industria láctea que durante años se pensó que era insignificante y que se utilizaba como alimento para animales o se eliminaba como desecho. Es un líquido acuoso, que se genera durante la elaboración del queso por coagulación y separación de proteínas de la caseína de la leche (Tsakali, Petrotos, D'Allessandro y Goulas, 2010). Según la CIL (2019) 724 713 l/d de lactosuero son producidos a nivel nacional, de los cuales solo 60 393 l/d son utilizados en la elaboración de bebidas lácteas.

Panesar, Kennedy, Gandhi y Bunko (2007) citados por Pescuma, Font de Valdez y Mozzi (2015) afirman que la composición del lactosuero varía dependiendo de varios factores: 1) tipo de lactosuero, dulce obtenido de la adición de cuajo en un pH mínimo de 5.6 para inducir el coágulo o ácido resultado de la fermentación por cultivos de *Lactobacillus* sp. o mineral ácido a un pH máximo de 5.1 (Tsakali et al., 2010), 2) fuente de la leche (vaca, oveja, etc.), 3) alimentación de los animales usada para la producción de leche, 4) el tipo de procesamiento de queso, 5) época del año y 6) etapa de lactancia.

De acuerdo con Buyukkileci y Harsa (2004), el lactosuero dulce contiene concentraciones (m/v) aproximadas de 5 % de lactosa, 1 % de proteínas, 0.4 % de grasa y algunos minerales, teniendo un alto contenido de demanda biológica de oxígeno (40000-60000 ppm) lo cual representa serios problemas ambientales.

La norma NTE INEN 2594 (2011) define al lactosuero de leche como “producto lácteo líquido obtenido durante la producción de queso, la 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” (p.1), cuyos requisitos son

(tabla 1):

**Tabla 1**

*Requisitos físico-químicos de lactosuero de leche líquido*

<b>Requisitos</b>	<b>Lactosuero dulce</b>	<b>Lactosuero ácido</b>	<b>Método de ensayo</b>
Lactosa, % (m/m)	4.4-5	≤4.3	AOAC 984.15 (2012)
*Proteína láctea, % (m/m)	0.8	0.8	NTE INEN 16 (2015)
Grasa láctea, % (m/m)	0.3	0.3	NTE INEN 12 (1973)
Ceniza, % (m/m)	0.7	0.7	NTE INEN 14 (1983)
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	≤0.16	≥0.35	NTE INEN 13 (1984)
pH	6.8-6.4	5.5-4.8	AOAC 973.41 (1998)

\*El contenido de proteína láctea es igual a 6.38 por el % de nitrógeno total determinado

**Fuente:** NTE INEN 2594 (2011)

Dependiendo de la acidez, pH y contenido de lactosa, el lactosuero de leche líquido se clasifica en dulce o ácido. En el lactosuero dulce el contenido de lactosa es superior y la acidez es menor a la que presenta el lactosuero ácido (NTE INEN 2594, 2011).

Según Tsakali et al. (2010) el lactosuero es un producto muy interesante debido a su composición, sus propiedades la hacen una gran base para la creación de nuevos productos o una alternativa para la creación de productos tradicionales. Durante las últimas décadas se han realizado varias investigaciones sobre los componentes del suero, especialmente lactosa y sus principales proteínas como la  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina y albúmina de suero de bovino.

De acuerdo con Reddy, Henderson y Erdman (1976) el suero de leche contiene alto contenido de nutrientes reciclables mediante procesos para la fermentación bacteriana de lactosa del suero y producir ácido láctico, sales de ácido láctico o proteína microbiana.

## 2.2 ÁCIDO LÁCTICO

James (2015) define el ácido láctico como un compuesto químico orgánico que juega un papel muy importante en varios procesos bioquímicos. Este compuesto fue descubierto por primera vez en 1780 por el químico sueco Scheele. Es un ácido orgánico natural que puede ser producido por fermentación o síntesis química, se encuentra presente en muchos alimentos, tanto de forma natural o como producto de la fermentación microbiana en varios alimentos fermentados (Datta y Tsai, 1997).

El ácido láctico es un ácido carboxílico cuya fórmula química es  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ , este compuesto quiral tiene dos isómeros ópticos, uno de ellos es conocido como L(+) ácido láctico (isómero biológicamente importante) y el otro es su imagen especular o D(-) ácido láctico (James, 2015). El ácido láctico isómero L(+) tiene una rotación específica de  $+3.8^\circ$ , es decir, que la dirección de la luz polarizada va en sentido horario (Piassi, Fontes, Sass y Contiero, 2016).

Hoy en día, el ácido láctico L(+) es principalmente (90 %) producido por fermentación, usando bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras seleccionados. Por el contrario, siempre se obtiene una mezcla isómeros L(+) y D(-) de ácido láctico cuando se aplican métodos químicos (Pescuma et al., 2015). Una de las grandes ventajas del proceso de fermentación es la posibilidad de utilizar desechos agroindustriales para obtener ácido láctico L(+) (Piassi et al., 2016).

Según Mohanty, Das, Nanda, Nayak y Pradhan (2015) la producción de ácido láctico por fermentación microbiana proporciona una mejor alternativa para frenar el desarrollo de la contaminación causada por industrias petroquímicas.

Mohanty et al. (2015) afirman que el ácido láctico es un compuesto muy utilizado por las industrias químicas y que puede ser producido naturalmente microorganismos a escala de laboratorio.

Según Ghaffar et al. (2014) el ácido láctico comercialmente puro puede ser obtenido por fermentación microbiana a partir de las siguientes fuentes de carbohidratos como: glucosa, sacarosa, lactosa, almidón, maltosa derivados de materias primas como azúcar de remolacha, melaza, suero y malta de cebada.

### 2.2.1 PROPIEDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico L (+) al 88 % de pureza (tabla 2) es producido por fermentación. Es un líquido transparente, higroscópico, casi inodoro con leve sabor ácido. Su coloración en temperatura ambiente es de 10 hazen y no excede de 50 hazen después de calentarse por dos horas a 200 °C. Es soluble en agua y alcohol (Galactic, 2019).

**Tabla 2**

*Propiedades físico-químicos del ácido láctico al 88 %*

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Nombre químico	2-hidroxipropanoico ácido
Peso molecular	90
Formula molecular	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
Densidad (20 °C)	1.19-1.21
Solubilidad	soluble en agua y etanol

**Fuente:** Galactic (2019)

En un estudio realizado por Mohanty et al. (2015) obtuvieron ácido láctico crudo, cuyas concentraciones fueron de 3.9 a 10.5 % en 100 ml de muestra, mientras que sometidos a un proceso de purificación mediante un intercambiador de aniones débil en forma de celulosa DEAE (dietilaminoetil celulosa) se llegaron a concentraciones del 85% en 100 ml de muestra.

De acuerdo a Ghaffar et al. (2014) el ácido láctico puede ser obtenido por procesos químicos y por la fermentación microbiana; sin embargo, el método de obtención con bacterias ácido lácticas tiene ventaja sobre el otro método, debido a que de él se puede extraer ácido láctico puro, mientras que por la síntesis química siempre quedarán

mezclas racémicas.

Gonzales et al. (2008) citados por Ghaffar et al. (2014) afirma que la recuperación de ácido láctico debe ser mejorada para reducir las pérdidas de ácido láctico y para mejorar su pureza. Por ello los procesos de purificación son importantes, a razón de que el caldo fermentado contiene un sinnúmero de impurezas como residuos de azúcares, color, nutrientes, otros ácidos orgánicos y biomasa generada.

Los procesos de purificación de ácido láctico más utilizados son: cromatografía de intercambio iónico, sistemas de membrana de ultra y microfiltración (Ghaffar et al., 2014).

De acuerdo a Miller et al. (2011) una vez obtenido el concentrado el caldo con ácido láctico por fermentación, acidificado y evaporizado, es necesario un proceso de purificación adicional para producir ácido láctico puro de grado alimenticio, aún más si se lo destina a la producción de biopolímero. Esto implica procesos de cromatografía, formación de ésteres e hidrólisis, destilación y extracción con solventes

### **2.2.2 USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO**

El ácido láctico es un compuesto muy versátil, utilizado en diferentes industrias debido a sus propiedades. En Estados Unidos representa aproximadamente el 85% de la demanda por parte de las industrias de alimentos y el 15% restante son para usos industriales no alimenticios (Datta y Tsai, 1997).

Galactic (2019) afirma que el ácido láctico tiene varias aplicaciones como alimentarias, farmacéuticas, cosméticas e industriales. Galacid<sup>TM</sup> es la marca de su ácido láctico que cumple diferentes funciones razón por la cual su aplicación comprende lo siguiente: antimicrobiano, potenciador del sabor, control de pH, disolvente, humectante, hidratante, exfoliante suave, renovación celular, limpiador, quelante, desincrustante, ayuda para la desoxidación, desengrasante, intermediario quiral, materia prima para la síntesis química, etc. La tabla 3 muestra la pureza de ácido láctico utilizado en

diferentes áreas.

**Tabla 3**

*Usos de ácido láctico según su pureza*

Área	Pureza (%)
Alimentaria	25-90
Cosmética y farmacéutica	90
Industrial	88-90
Especialidades	80-98

**Fuente:** Galactic (2019)

El ácido láctico es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como en panadería (acidificar masas y dar sabores característicos del pan), bebidas, productos cárnicos (realzar los sabores en carnes), confitería, productos lácteos, aderezos para ensaladas. En los productos de confitería el ácido láctico proporciona un sabor leve a ácido, mejora la calidad al reducir la adherencia y prolonga su vida útil. En general el ácido láctico sirve como agente regulador de pH, conservante o aromatizante, es decir, ayuda a extender la vida útil del producto, mejora la seguridad alimentaria al inhibir el crecimiento de patógenos y mejora la retención de agua (Thongchul, 2013).

En productos farmacéuticos el ácido láctico se utiliza como regulador de pH, en productos de limpieza se emplea gracias a sus propiedades antibacteriales y desincrustantes y en la industria textil ayuda al proceso de la extracción del cuero (Thongchul, 2013).

El ácido láctico es utilizado como materia prima para la producción de ácido poliláctico (polylactic acid o *PLA* en siglas en inglés). El *PLA* es un compuesto biodegradable, termoplástico y poliéster alifático obtenido de la polimerización de ácido láctico. A pesar de que el *PLA* es conocido hace más de un siglo como material biodegradable y se utiliza en diferentes implementos, tales como tornillos reabsorbibles, suturas y dispositivos médicos. Este material durante años ha sido de interés comercial debido a la preocupación por la biodegradabilidad y cero emisiones de carbono por el cambio

climático (Thongchul, 2013).

## **2.3 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO**

### **2.3.1 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Borshchevskaya, Gordeeva, Kalinina y Sineokii (2016) desarrollaron un método espectrofotométrico eficiente y barato para la determinación de ácido láctico en estado individual, en alimentos, en cultivos biológicos y en líquidos. El método está basado en la determinación espectrofotométrica de la coloración del producto de la reacción de iones de lactato con iones de cloruro férrico a 390 nm.

#### **2.3.1.1 Determinación de ácido láctico de un medio líquido**

Las células se separan del medio líquido mediante el proceso de centrifugación. El sobrenadante se diluye 20 veces con agua destilada. La concentración de ácido láctico de la muestra es determinada por el método de espectrofotometría. La concentración de ácido láctico es calculada usando la curva de calibración (Borshchevskaya et al., 2016).

### **2.3.2 ACIDEZ TITULABLE**

Según la normativa NTE INEN 13 (1984) la acidez titulable de la leche es “la acidez de la leche, expresada convencionalmente como contenido de ácido láctico, y determinada mediante procesos normalizados”(p.1).

Se titula la acidez con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador.

## **2.4 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Collins, Phillips y Zannoni (1989) afirman que “las bacterias ácido lácticas se encuentran naturalmente en las leches fermentadas, carne, vegetales fermentados, boca e intestino humano y en el ambiente” (p.105).



Las bacterias ácido lácticas son capaces de crecer en el lactosuero y el permeado del lactosuero para producir el ácido láctico como producto principal de la fermentación de la lactosa (Pescuma et al., 2015).

Pescuma et al. (2015) menciona que las especies de lactobacillus que utilizan lactosuero de leche como sustrato para crecimiento y producción de ácido láctico más estudiados se muestran en la tabla 4:

**Tabla 4**

*Bacterias ácido lácticas productoras de ácido láctico*

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Descriptor</b>
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	Jensen
<i>Lactobacillus</i>	<i>bulgaricus</i>	Grigorov
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Moro

Sin embargo, algunas cepas bacterianas ácido lácticas no son capaces de crecer en exceso de lactancia, ya que sus complejos requerimientos de nutrientes no se cumplen; por esta razón, algunos autores han añadido extracto de levadura al lactosuero o han desarrollado métodos en los que las células se mantienen en estados no proliferantes (Pescuma et al., 2015).

Las bacterias ácido lácticas pueden crecer a temperaturas entre 5 - 45°C y son tolerantes a pH ácido. La mayoría de estas cepas pueden crecer a pH bajos como 4.4 mientras que el pH óptimo es 5.5-6.5 (Thongchul, 2013).

Según Mohanty et al. (2015) las bacterias ácido lácticas pueden crecer en rangos de pH de 3.5-10 y a temperaturas de 5-45°C, y sus condiciones óptimas de crecimiento varían dependiendo de lo que vayan a producir. Estas bacterias requieren de algunos elementos para crecer como, fuentes de carbono y nitrógeno, en forma de carbohidratos, ácidos aminos, vitaminas y minerales.

### ***Lactobacillus casei***

Según Disck, Plessis, Dellaglio y Lauer (1996) *L. casei* forma parte de un grupo de diversas especies de características mesofílicas, ácido lácticas, anaerobias facultativas y hemofermentativas.

Según Mori et al. (1997) esta bacteria se caracteriza por ser Gram positiva, anaerobia facultativa, heterofermentativa facultativa y no formar esporas.

Según Walstra, Wouters y Geuters (2006) citados por Arellano (2013) este microorganismo produce ácido láctico predominante de la forma L (+), no metabolizan el citrato y no es capaz de producir diacetilo; se utiliza en la industria láctea en la elaboración de prebióticos, y se puede utilizar en asociación con otras bacterias ácido lácticas o solo, para crear diferentes propiedades organolépticas. Es muy resistente a intervalos muy amplios de pH, temperatura.

De acuerdo con el estudio realizado por Narayanan, Roychoudhury y Srivastava (2004), *L. casei* prefiere la lactosa para su crecimiento y para la producción de ácido láctico, seguido maltosa; mientras que la sacarosa fue poco usada.

## **2.5 MEDIOS DE CULTIVO**

La norma NTE INEN 1529-1 (1999) define al medio de cultivo como “cualquier sustancia nutritiva, sólida o líquida, que pueda ser utilizada en el laboratorio para el crecimiento de los microorganismos, adicionada o no de sustancias enriquecedoras, selectivas, indicadoras y tamponantes” (p.1).

### **2.5.1 REQUERIMIENTO ENERGÉTICO Y NO ENERGÉTICO**

Granados y Villaverde (2007) señalan que “en procesos llevados dentro de laboratorios las bacterias son cultivables en medios artificiales de laboratorio de tal manera que estos medios de cultivo les proporciona elementos necesarios para su crecimiento y

multiplicación” (p.3).

### **Requerimientos energéticos**

Los requerimientos energéticos son los nutrientes de ese medio de cultivo, que serán utilizados por las bacterias para su crecimiento. Las fuentes energéticas son:

**Carbono:** Existen muchas fuentes de carbono que están muy ligados al metabolismo energético de la especie microbiana, algunas bacterias son capaces de utilizar sustancias muy sencillas como ácido acético, alcohol, citrato sódico o azúcares como glucosa, maltosa, lactosa, almidón, etc.

**Nitrógeno:** Es una fuente menos energética que el carbono, se obtiene de proteínas, péptidos, aminoácidos, extractos de carne, sales de amonio, etc.

### **Requerimientos no energéticos**

Son nutrientes que no proporcionan energía, pero son necesarios para el desarrollo de los microorganismos. Las fuentes no energéticas son:

**Azufre:** Todos los microorganismos que utilizan en su metabolismo azufre lo hacen de forma de sulfatos, tiosulfatos y de aminoácidos.

**Fósforo:** Las bacterias utilizan fósforo en forma de fosfatos.

**Iones metálicos:** Son el Na, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Mo, etc.

## **2.5.2 CONDICIONES QUE DEBE CUMPLIR UN MEDIO DE CULTIVO**

Según Granados y Villaverde (2007) para el mejor crecimiento de bacterias en un medio de cultivo es necesario una adecuada composición de nutrientes y condiciones físico-químicas apropiadas.

**Temperatura:** El grado de temperatura depende de la especie microbiana, por lo que

las bacterias son: psicrótrofas cuando crecen a temperaturas inferiores a 20 °C, mesófilas si crecen a temperaturas comprendidas entre 18 y 45 °C y termófilas cuando crecen a temperaturas mayores a 45 °C.

**Humedad:** Es la cantidad de agua que los microorganismos requieren para su crecimiento.

**pH:** El pH óptimo en la mayoría de los casos es próximo a la neutralidad, aunque existen bacterias que crecen en condiciones de pH muy ácido o alcalinos.

Existen sustancias que se utilizan para estabilizar el pH del medio, estas sustancias se denominan buffers o tampones.

**Presión osmótica:** Por lo general las bacterias se encuentran en condiciones de isotonía.

**Oxígeno:** Existen bacterias aerobias que necesitan oxígeno, facultativas que requieren o no oxígeno para su crecimiento y las anaerobias que no necesitan de este elemento.

### **2.5.3 AGAR Y CALDO MRS**

Los medios de cultivo agar y caldo desarrollados por Man, Rogosa y Sharpe (MRS), estos medios proporcionan un buen ambiente para el mejor desarrollo de *Lactobacillus* y otras bacterias ácidos lácticas, con la única diferencia de que el agar es sólido debido al componente del mismo nombre y el caldo es líquido al no contener agar (Merck, 2013).

El medio de cultivo (tabla 5) permite un abundante desarrollo de todas las especies de *Lactobacillus*. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

**Tabla 5***Contenido de agar MRS*

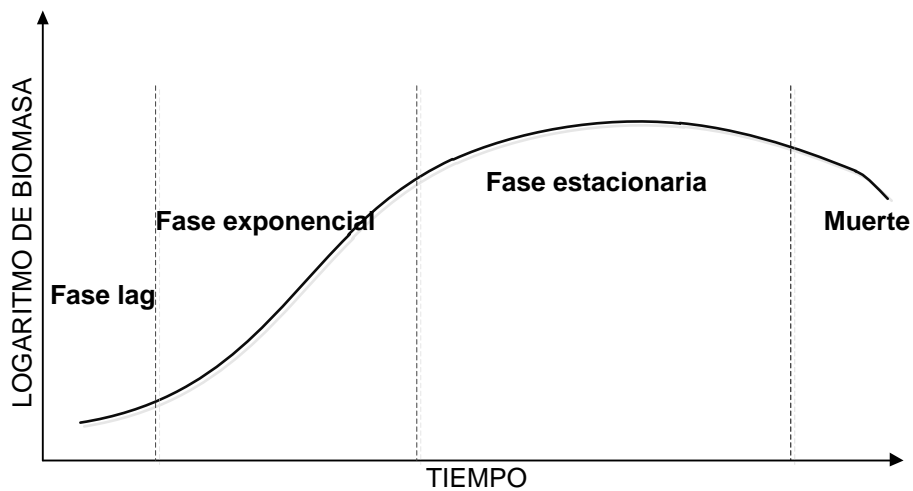
<b>Fórmula</b>	<b>Cantidad (g/l)</b>
Proteosa peptona N° 3	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Glucosa	20
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	13
pH final	6.4 ± 0.2

## **2.6 CRECIMIENTO MICROBIANO**

El crecimiento microbiano en un sistema biológico, se define como el incremento ordenado de todos los componentes químicos. Dicho proceso es de suma importancia en los procesos fermentativos, su monitoreo permite el control de la producción del metabolito de interés (Rodríguez, Cabrera y Valencia, 2003).

Rodríguez et al. (2003) señalan que toda cepa de microorganismos cultivado en un medio, en un proceso de fermentación pasa por diversas fases (figura 1). Dichas etapas son: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

La fisión binaria y otros procesos de división celular causan un incremento en el número de células de una población. El incremento poblacional es estudiado mediante el análisis de la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando se cultivan microorganismos en medio líquido, generalmente suele hacerse en un cultivo discontinuo o sistema cerrado; es decir, los microbios son inoculados en un recipiente al que no se le añade o sale ninguna sustancia (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009).



**Figura 1.** Curva de crecimiento en un sistema discontinuo.

## 2.6.1 FASES DEL CRECIMIENTO

### Fase de Latencia

Cuando se introducen microorganismos en un medio de cultivo fresco, generalmente no se produce un aumento inmediato del número de células; este periodo inicial se llama fase de latencia (lag). Aunque no hay división celular inmediatamente, ni existe un incremento neto de masa, la célula está sintetizando nuevos componentes (Willey et al., 2009).

La duración de la fase de latencia varía considerablemente dependiendo del estado de los microorganismos y de la naturaleza del medio. Esta fase puede ser bastante larga si el inóculo procede de un cultivo viejo que ha sido refrigerado. La inoculación en un medio químicamente diferente también da lugar a una fase de latencia más larga. Por otro lado, la fase de latencia será corta o incluso inexistente cuando se transfiere un cultivo joven, en fase exponencial y en crecimiento vigoroso, a un medio fresco de igual composición (Willey et al., 2009).

### **Fase exponencial**

Durante la fase exponencial o logarítmica (log), los microorganismos crecen y se dividen a la velocidad máxima posible que les permite su potencial genético, la naturaleza del medio, y las condiciones de cultivo. La velocidad de crecimiento es constante; es decir, los microorganismos se dividen y su número se duplica a intervalos regulares. Ya que cada célula individual se divide en un momento ligeramente diferente, la curva de crecimiento se eleva suavemente en vez de hacerlo a saltos. Durante esta fase la población es muy uniforme en cuanto a sus propiedades químicas y fisiológicas; por ello suelen usarse cultivos en fase logarítmica para los estudios bioquímicos y fisiológicos (Willey et al., 2009).

### **Fase estacionaria**

En un sistema cerrado, llega un momento en el que el crecimiento de la población se detiene y la curva de crecimiento decrece. Los cultivos bacterianos suelen alcanzar esta fase estacionaria cuando la población asciende a unas  $10^9$  cél./ml. En general, otros organismos no alcanzan densidades poblacionales tan elevadas. Evidentemente el tamaño final de la población varía en función de la disponibilidad de nutrientes y otros factores, además del tipo de microorganismo cultivado. El número de viables permanece constante, esto puede ser debido a un equilibrio entre división celular y muerte celular (Willey et al., 2009).

Las poblaciones microbianas entran en fase estacionaria por diversas razones como la limitación de nutrientes (si la concentración de un nutriente esencial disminuye gravemente el crecimiento de la población también), la acumulación de productos residuales tóxicos y cuando alcanza una densidad poblacional crítica. Las bacterias de un cultivo discontinuo pueden entrar en fase estacionaria como respuesta a la escasez de nutrientes (Willey et al., 2009).

## **Senescencia y la muerte**

Durante muchos años, la disminución del número de células viables que sigue a la fase estacionaria era descrita simplemente como la fase de la muerte. Se asumía que los cambios ambientales perjudiciales como la privación y la acumulación de desechos tóxicos causaban daños irreparables que daba lugar a la pérdida de viabilidad. Es decir, aunque las células bacterianas fueran transferidas a un medio fresco no se observaba ningún crecimiento celular. Se suponía que las células morirían, pero no sufrían lisis, pues la pérdida de viabilidad a menudo no iba acompañada de una pérdida en el número total de células (Willey et al., 2009).

## **2.7 SISTEMA DE BANCO DE CÉLULAS**

En un sistema de banco de células, los lotes sucesivos se fabrican por cultivo en células derivadas de un mismo Banco Maestro de Células (BMC) para lo cual debe validarse el mayor número de viales permitido durante su producción (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT], 2013).

### **Banco maestro de células**

Según Poutou, Martínez y Frontela (1994) el banco de células primario (BPC) o BMC, consiste en un conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo microbiológicamente puro que se almacena bajo condiciones que garanticen su estabilidad genética.

Según ANMAT (2013) un BMC es un cultivo de células distribuido en envases resultantes de una única operación, procesado y conservado de tal manera que se evite la contaminación y quede garantizada la uniformidad y la estabilidad y normalmente se almacena a una temperatura de -20 a -70 °C.

A partir del BPC se preparan el Banco de Células de Trabajo (Poutou et al., 1994).



### **Banco de trabajo de células**

Son los lotes sucesivos cultivados de células derivadas del banco maestro de células destinado a la preparación de cultivos celulares para la producción, se distribuye en envases, se procesa y se almacena del modo descrito para el banco maestro de células (ANMAT, 2013).

La criopreservación es un proceso rápido, con baja contaminación, poco laborioso, económico y mantiene las propiedades genéticas, emplea crioprotectores que protegen a las células del daño que puedan producir durante la congelación (Parra, Pérez, Morales, Suárez y Montoya, 2006).

## **2.8 FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA**

Petrov, Petrova y Beschkov (2007) afirman que la síntesis química para la obtención de una mezcla racémica de ácido láctico es un proceso costoso y no amigable con el medio ambiente debido a que requiere materiales a base de crudo de petróleo como carbón, gases naturales y condiciones drásticas.

La fermentación microbiana es un proceso amigable con el medio ambiente por tanto que proporciona beneficios a nivel económico y ambiental (Thongchul, 2013).

Según Thongchul (2013) las bacterias ácido lácticas se dividen en dos grandes grupos:

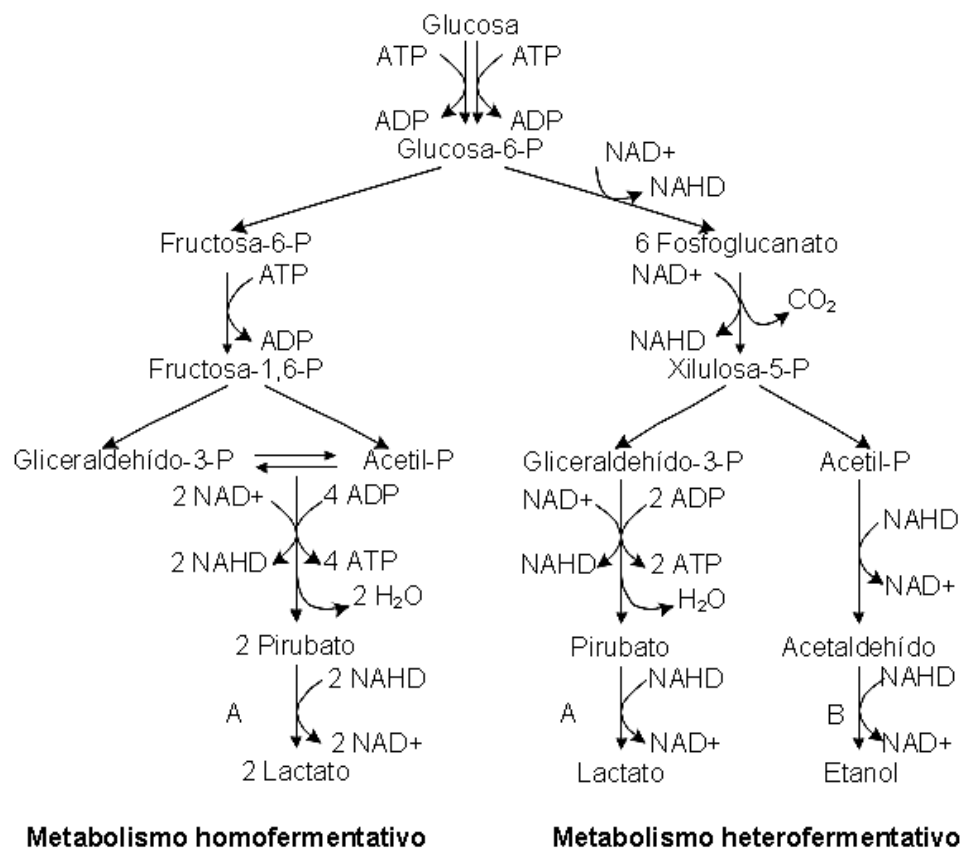
### **Homofermentativas**

Las bacterias de este grupo convierten más del 85% de glucosa en ácido láctico (principal producto de la fermentación). Fermentan 1mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, generando un rendimiento neto de 2 ATP por mol de glucosa metabolizado. En la figura 2 se muestra la ruta metabólica de la bacteria homofermentativa (Thongchul, 2013).

## Heterofermentativas

Este grupo de bacterias ácido lácticas convierte el 50% de glucosa en ácido láctico más etanol o ácido acético y 50% de CO<sub>2</sub>. Fermentan 1 mol de glucosa en 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol (o ácido acético) y 1 mol de CO<sub>2</sub>.

Para el inicio del proceso de producción de ácido láctico se inicia con un pretratamiento del sustrato, seguido de la fermentación (figura 2) por lotes o por sistema continuo.



**Figura 2.** Conversión de glucosa por bacteria ácido lácticas

Fuente: Thongchul (2013)

## 2.9 BIOPROCESO DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En la actualidad, ninguna bacteria tolerante a los ácidos ha sido genéticamente modificada o aislada que sea capaz de producir ácido láctico a velocidades o

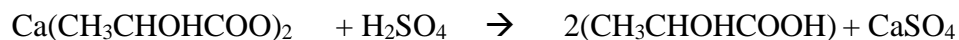
rendimientos industriales a valores de pH < 4.5, lo que significa que la solución clave para la producción bacteriana de ácido láctico de bajo costo y bajo contenido de carbono aún se encuentra en investigación (Miller et al., 2011).

Miller et al. (2011) y Thongchul (2013) mencionan que el ácido láctico producido en el proceso bacteriano tradicional debe neutralizarse para mantener el pH dentro del intervalo de viabilidad de los microorganismos. A escala industrial, esto se hace típicamente usando hidróxido de calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) o carbonato de calcio, que se añade al medio de fermentación. Además, la recuperación del ácido láctico a partir de la sal de lactato de calcio se basa en ácidos fuertes como el ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

a) Fermentación y neutralización



b) Acidificación por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Según las ecuaciones estequiométricas 1 y 2; 1 mol de glucosa produce 2 moles de ácido láctico. El Ca(OH)<sub>2</sub> es usado para mantener el pH óptimo para el crecimiento de la bacteria ácido láctica. Un mol de lactato de calcio es obtenido simultáneamente durante la fermentación y adición de Ca(OH)<sub>2</sub>. En operación por lotes, al final de la fermentación, el caldo que contiene el lactato de calcio se filtra para eliminar la biomasa celular y acidificada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para producir una forma libre de ácido láctico y CaSO<sub>4</sub> (Miller et al., 2011 y Thongchul, 2013).

## 2.10 BIORREACTOR

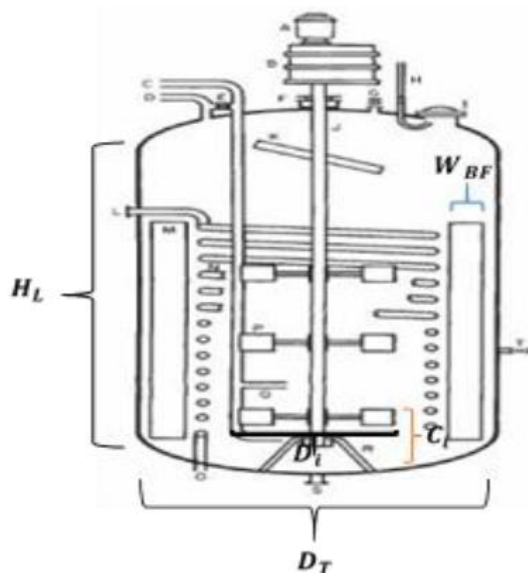
Los biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado fermentador), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruiz,

Rodríguez, Rodríguez, Contreras y Aguilar, 2007).

Las condiciones de cultivo que proporciona un biorreactor, deben contar con controles de temperatura, pH, sustrato, sales y oxígeno, para así convertir las materias primas y obtener mejores rendimientos de los metabolitos deseados (Rodríguez et al., 2003).

### 2.10.1 BIORREACTOR DISCONTINUO DE TANQUE AGITADO

El biorreactor discontinuo de tanque agitado es el fermentador más ampliamente utilizado a escala industrial (Figura 3), estos equipos trabajan por lotes, es decir, el sustrato y suplementos requeridos para efectuar el proceso son depositados en el tanque del biorreactor desde el inicio de la operación; después de un tiempo determinado, dependiendo de la cinética de la reacción, al concluirse la conversión de la materia prima los productos son retirados del tanque (Ruiz, 2017).



**Figura 3.** Esquema de biorreactor discontinuo de tanque agitado

Fuente: Palacios, Vallejos et al., 2019.

El tiempo de operación necesario puede ir desde horas a varias semanas, dependiendo de la conversión y las condiciones de operación. Durante la operación debe evitarse la contaminación, mantener la agitación y controlar el pH y la temperatura. Operan con baja densidad celular, sobre todo en la fase inicial del proceso y debe evitar la

alimentación de altas concentraciones de sustrato para evitar la inhibición por éste o por producto (Barba y Clausell, 2014).

Rodríguez et al. (2003) mencionan que entre las operaciones que puede realizar este equipo son:

- Homogenización: para mantener temperatura y distribución de concentración uniformes.
- Mezcla sólido-líquido: para mantener una suspensión con una distribución de sólidos uniforme.
- Proceso líquido/líquido: para dispersar una fase en otra, formar emulsiones y realizar extracciones.
- Intercambio de calor.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

##### 3.1.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones de Unidades Educativas Productivas de la Carrera de Agroindustria de la Universidad Técnica del Norte.

Los análisis físico-químicos y microbiológicos se efectuaron en los laboratorios de la Universidad Técnica del Norte perteneciente a la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales ubicada en la zona 1, provincia de Imbabura, cantón Ibarra (tabla 6).

**Tabla 6**

*Ubicación del área de trabajo*

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Ubicación	0° 21' 41'' de latitud norte y sur 78° 07' 02''
Altura	2225 m.s.n.m.
Clima	Seco templado, aproximadamente 18 °C
Precipitaciones	623mm/año

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

#### 3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

##### 3.2.1 MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Cepa de bacterias ácido lácticas liofilizadas: *Lactobacillus casei*-01
- Lactosuero dulce
- Agar y caldo MRS

- Agua destilada
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$
- $\text{H}_2\text{SO}_4$
- $\text{FeCl}_3$
- Ácido láctico 88 %

### **3.2.2 MATERIALES**

- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Asas de cultivo
- Porta y cubre objetos
- Pipetas y micro pipetas
- Probeta
- Vasos de precipitación
- Mechero
- Gradillas
- Termómetro
- Potenciómetro
- Cintas de pH
- Matraz
- Probeta de 50 ml
- Buretas
- Soporte universal
- Pinzas para bureta
- Matraces Erlenmeyer
- Perilla de hule
- Embudos
- Frasco lavador

### **3.2.3 EQUIPOS**

- Incubadora
- Microscopio
- Balanza analítica
- Centrifuga
- Autoclave
- Refrigerador
- Biorreactor tipo tanque agitado de 4 litros
- Estufa
- Control automático de pH



### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Para dar resultado a este objetivo se realizó análisis físico- químico de los componentes del lactosuero para tener conocimiento de las características iniciales que inciden de manera directa en el producto obtenido, además el valor de pH ayudó a clasificar al lactosuero como dulce, en la tabla 7 se presentan los métodos de ensayo utilizados en la fase experimental:

**Tabla 7**

*Análisis físico-químicos de lactosuero*

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	MÉTODO DE ENSAYO
Sólidos totales	AOAC 925.23 (1925)
Proteína	AOAC 991.20 (1994)
Lactosa	Refractometría (Páez, Pérez, Araujo, Mármol y Rincón, 2012)
Grasa láctea	AOAC 960.16 (1961)
Acidez titulable % (calculada como ácido láctico)	AOAC 947.05 (1990)
pH	AOAC 973.41 (1998)

#### Fundamentos de los métodos usados

##### Sólidos totales

Según la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (1925) señala que el método AOAC 925.23 para cuantificar sólidos totales se fundamenta en determinar el producto resultante de la desecación del líquido mediante la evaporación del líquido y se pesa; es decir, es la diferencia entre el peso fresco del alimento y el contenido de agua presente en el mismo, este se denominado como contenido de materia seca o sólidos totales, proceso que se realiza en una estufa y el resultado se expresa generalmente en gramos por kilo (g/kg) o en tanto por ciento (%).

## **Proteína**

Según la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (1994) señala que el método AOAC 991.20 para cuantificar proteínas consiste en señalar la cantidad de nitrógeno presente en el líquido es expresada convencionalmente como como contenido de proteínas mediante la digestión 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.

## **Lactosa**

Para la determinación de contenido de lactosa se utilizará el método de refractometría usado por Páez et al. (2012) el cual consiste en la medición de grados brix con un refractómetro para corroborar la concentración de lactosa en el lactosuero.

Según Kirk, Sawyer y Egan (2004) citados por Suh y Rodríguez (2017) un grado brix es equivalente a 1g de soluto en 100 g de solución o es igual a 1 % de azúcar de la solución de 100g. Para evitar errores en la lectura, el lactosuero debe ser centrifugado con la finalidad de eliminar sólidos que interfieran con la medición de lactosa.

## **Grasa láctea**

Según la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (1961) el método de Gerber descrito en la AOAC 960.16 señala que, para determinar grasa láctea se debe someter al líquido en un butirómetro que separar la grasa por centrifugación después de disolver la proteína con ácido sulfúrico, para que la separación sea mejor sañade una pequeña cantidad de alcohol iso-amílico. El butirómetro se gradúa para una lectura directa del contenido de grasa.

## **Acidez titulable % (calculada como ácido láctico)**

Según la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (1990) el método de ensayo descrito en la AOAC 947.05 señala que la acidez titulable está presente en el líquido,

expresada convencionalmente como contenido de ácido láctico, y es determinado mediante titulación de la muestra con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador.

La acidez titulable se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$A = 0.090 \frac{V \times N}{m1 - m} \times 100$$

Donde:

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 la Asociación Internacional de Químicos Analíticos (1998) la metodología para determinar el pH descrita por la AOAC 973.41, señala que es un método cuantitativo para el cual el alimento medido por un potenciómetro.

### **3.3.2 DETERMINACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE TEMPERATURA Y pH QUE MAXIMICE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE ÁCIDO LÁCTICO.**

Para el desarrollo de este objetivo se optó por el uso de un paquete estadístico, Design Expert 11.0 que ayuda con el diseño del experimento, analiza los datos y visualiza resultados.

#### **3.3.2.1 Método del experimento**

La investigación se basó en una fase experimental utilizando el Método de superficie de respuesta (RSM). Una vez identificados los factores se realizó corridas para

desarrollar la localización de las condiciones óptimas de los factores, puesto que “óptimo” implica a menudo un mínimo o máximo; los diseños para optimización implican por lo menos tres niveles por cada factor para poder estimular la curvatura.

El tipo del método de superficie de respuesta que se utilizó fue el Diseño Central Compuesto, aplicado para la optimización que inicia con un diseño factorial estándar a dos niveles y agrega dos corridas adicionales para cada factor. Las corridas adicionales, llamadas puntos estrella, son localizadas en distancias pequeñas abajo del nivel bajo de un factor y a la misma distancia arriba del nivel alto, esto permite la estimación de la curvatura con respecto a ese factor. Mientras cada factor se empieza variándose, los otros factores son fijados en sus valores centrales.

Desing- Expert 11.0 ayudó a encontrar la configuración óptima del proceso para lograr el máximo rendimiento del proceso.

### 3.3.2.2 Factores en estudio

Los factores en estudio y sus valores proporcionados por el programa estadístico para la productividad volumétrica del ácido láctico se pueden observar en la tabla 8:

**Tabla 8**

*Factores en estudio: temperatura y pH*

Temperatura	Nivel (°C)	pH	Nivel
A1	29.00	B1	4.80
A2	31.10	B2	5.00
A3	37.00	B3	5.50
A4	42.70	B4	6.00
A5	45.00	B5	6.20

### 3.3.2.3 Tratamientos

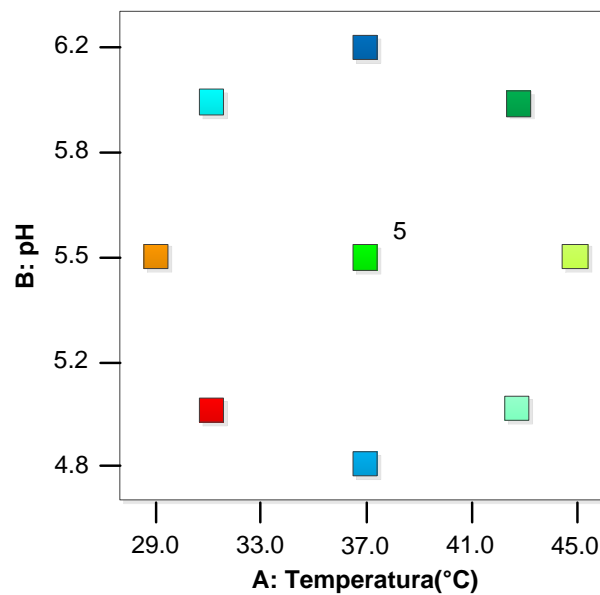
Para esta investigación en el diseño experimental se obtuvieron:

13 tratamientos, con 5 repeticiones al punto central, una en los puntos axiales y una en la porción factorial (tabla 9):

**Tabla 9**  
*Tratamientos para la producción de ácido láctico*

Tratamientos	Factor A: Temperatura (°C)	Factor B: pH
T1	37.00	5.50
T2	37.00	5.50
T3	31.30	6.00
T4	37.00	5.50
T5	37.00	5.50
T6	37.00	5.50
T7	29.00	5.50
T8	42.70	5.00
T9	37.00	4.80
T10	45.00	5.50
T11	37.00	6.20
T12	31.30	5.00
T13	42.70	6.00

Para una mejor apreciación del análisis estadístico Desing- Expert 11.0 proporciona la representación gráfica de los tratamientos (figura 4):



**Figura 4.** Representación gráfica de los tratamientos

### 3.3.2.4 Diseño experimental

La optimización de las condiciones de fermentación se realizó por combinaciones de los niveles de los dos factores independientes: temperatura de incubación (29-45 °C) y pH (4.8-6.2) para la maximización de la productividad volumétrica del ácido láctico (tabla 9).

Con la finalidad de optimizar el proceso se optó por el uso de un Diseño Compuesto Central, el paquete estadístico Desing Expert 11.0 propuso trece tratamientos aleatorizados.

La correlación entre las variables independientes y la variable dependiente fueron expresadas en función de un modelo estadístico cuadrático:

$$P = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1*2} X_1 X_2 + \beta_1^2 X_1^2 + \beta_2^2 X_2^2 + \varepsilon$$

Donde:

**P:** productividad volumétrica de ácido láctico (g/l·h)

**X<sub>1</sub>:** Factor A (Temperatura °C)

**X<sub>2</sub>:** Factor B (pH)

**$\beta_0$ :** es el coeficiente constante

**$\beta_1$ :** representa el efecto del factor X<sub>1</sub> (Temperatura de incubación)

**$\beta_2$ :** representa el efecto del factor X<sub>2</sub> (pH)

**$\beta_{1*2}$ :** representa el efecto de las interacciones entre los factores X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>

**$\beta_1^2$ :** representa el efecto cuadrático del factor X<sub>1</sub>

**$\beta_2^2$ :** representa el efecto cuadrático del factor X<sub>2</sub>

**$\varepsilon$ :** componente del error aleatorio del modelo

### 3.3.2.5 Unidad experimental

Cada unidad experimental estará constituida por un volumen de 2 litros de lactosuero dulce.

### 3.3.2.6 Variables a evaluar

Para los tratamientos propuestos se evaluó la productividad volumétrica (g/l·h) con la finalidad de encontrar un modelo que maximice el proceso. La productividad volumétrica del ácido láctico se cuantificó mediante el método espectrofotométrico y consumo de hidróxido de calcio a razón de que 1 mol de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  equivale a 2 moles de ácido láctico (Miller et al., 2011).

### 3.3.3 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICOS

Para la caracterización del ácido láctico obtenido fue necesario verificar su pureza con el fin de compararlo con productos comerciales de dicho ácido y destinarlo al uso de una industria sea alimenticia, cosmética, farmacéutica o biopolímeros, para lo cual se realizaron análisis físico-químicos, los mismos que se encuentran detallados en la tabla 10.

**Tabla 10**

*Análisis físico-químicos del ácido láctico obtenido*

<b>ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICOS</b>	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>
Concentración	Espectrofotometría (Borshchevskaya et al., 2016)
Acidez titulable	AOAC 947.05 (1990)
Color	Prueba de color E. Merck Darmstadt (2013)
Densidad	NTE INEN 11 (1984)
pH	AOAC 973.41 (1998)

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO UTILIZADO

#### Espectrofotometría

El método de la espectrofotometría desarrollado por Borshchevskaya et al. (2016) para la determinación de ácido láctico en alimentos sólidos, líquidos o en estado individual

consiste en la medición de absorbancia de luz a 390 nm que pasa a través de una solución muestra frente a una solución de referencia, para ello previamente se construye una curva de calibración.

### **Construcción de la curva de calibración para medir la concentración del ácido láctico obtenido**

La medición de la concentración del ácido láctico obtenido se realizó mediante el método de la espectrofotometría a 390 nm, para lo cual se realizó la construcción de la curva de calibración (Figura 5).

Para la construcción de esta curva calibración (figura 5) se utilizó una solución con una concentración conocida de ácido láctico, el cual se preparó a partir de un ácido láctico comercial al 88 % de concentración. Se prepararon 4 diluciones y se midió la absorbancia de cada una frente a la solución de referencia (tabla 11).

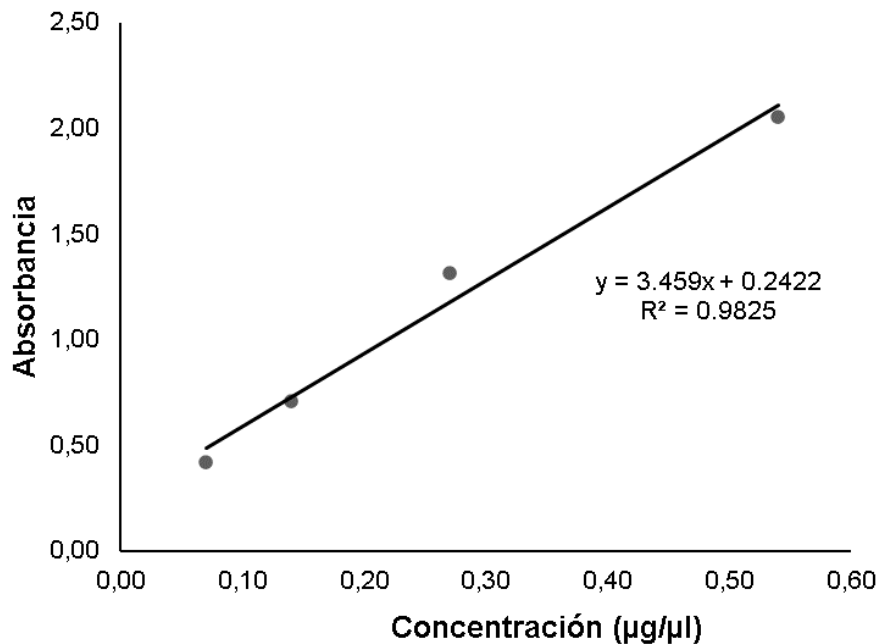
**Tabla 11**

*Datos para la construcción de la curva de calibración*

x(g/l)	$\bar{y}$
0.07	0.42
0.14	0.71
0.27	1.32
0.54	2.05

Los valores del eje x son las diluciones de la muestra preparadas mientras que los valores del eje y son las medias de las absorbancias obtenidas de cada una de las diluciones (tabla 10).





**Figura 5.** Curva de calibración para la determinación de ácido láctico

Para el cálculo de la concentración de ácido láctico se tomó en cuenta las diluciones que se realizaron a las muestras:

$$CM = \frac{\text{Absorción}}{\text{pendiente}} * \text{dilución}$$

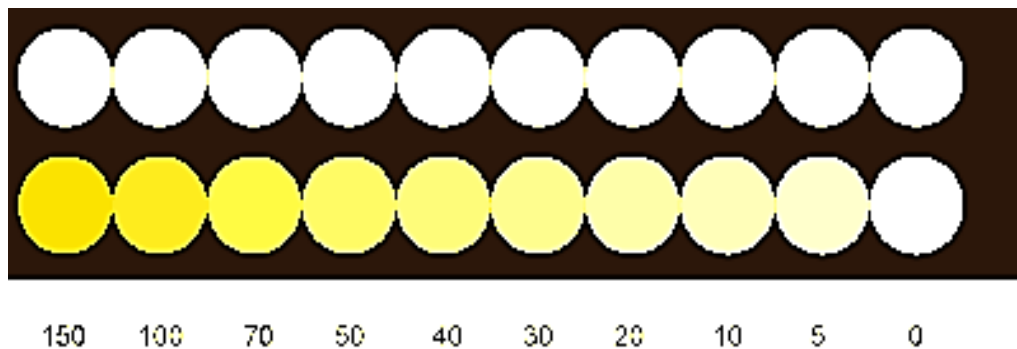
$$CM = \frac{2.19}{3.459} * 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$CM = 31.65 \text{g}/\text{l}$$

Para determinar la concentración en estado líquido la muestra fue llevada a centrifugación a 3820 FRC durante 15 minutos con el objetivo de eliminar cualquier sólido que influya en la medida de la absorbancia. El sobrenadante resultante fue diluido 20 veces con agua destilada. El cálculo de la concentración de ácido láctico se realizó utilizando la curva de calibración teniendo en cuenta la dilución de 20 veces de la muestra prueba (Borshchevskaya et al., 2016).

## Color

El método de prueba de color fue desarrollado por E. Merck D Darmstadt (2013) consiste en la determinación de color con comparador de tarjeta colorimétrica. El color de la muestra a examinar es determinado por comparación visual de la solución de medición con las zonas de color de una tarjeta colorimétrica. El resultado obtenido con la muestra no filtrada corresponde al color aparente causado por materias en suspensión. El valor de una muestra filtrada corresponde al color real.



**Figura 6.** Unidades de color Hazen (UPC)

Fuente: E. Merck D Darmstadt (2013)

## Densidad

Según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 11 (1984) el método para la determinación de densidad consiste en el uso de un densímetro graduado.

### 3.3.4 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 7) que inicia con la recepción de la materia prima y con la obtención de ácido láctico como del producto final.

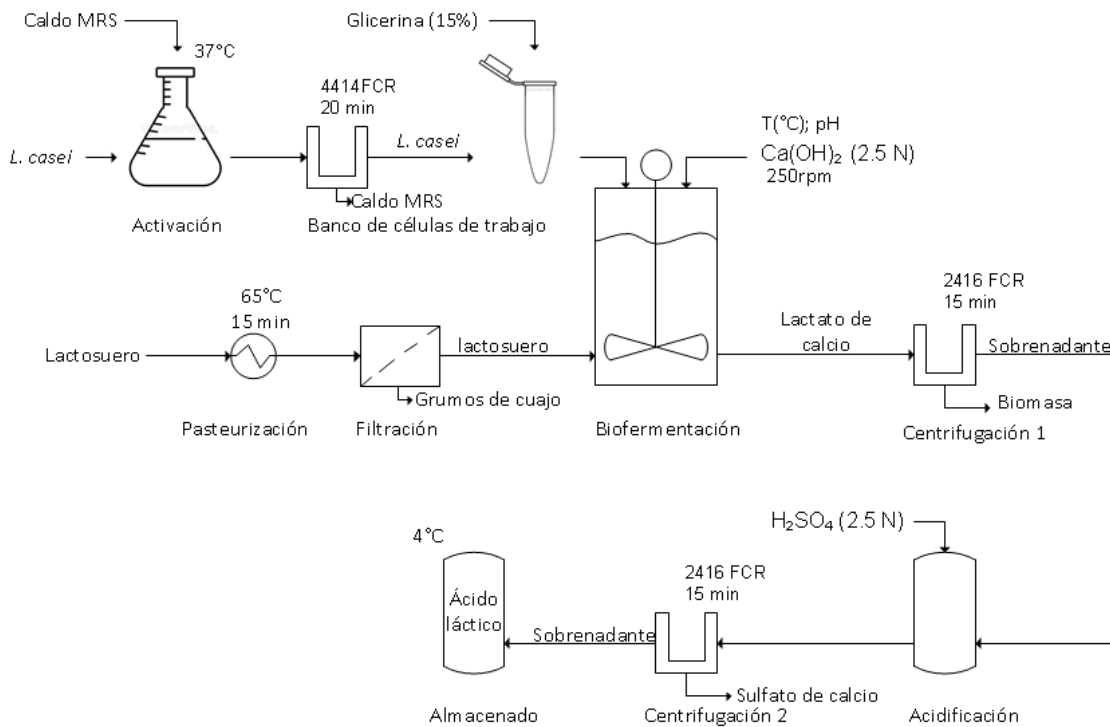


Figura 7. Diagrama de bloques para la producción de ácido láctico

#### Descripción del diagrama de bloques

El diagrama de bloques (figura 7) consta de los siguientes procesos:

#### Activación de *Lactobacillus casei* -01 liofilizado

La conservación de microorganismos por liofilización es un método de conservación agresivo pudiendo causar daño celular, reducción significativa de viabilidad y actividad microbiana (Rodríguez, Giraldo y Montes, 2016), por esta razón se optó por la

activación de *L. casei* -01 mediante el método descrito por García, Arrázola y Villalba (2013), el cual consiste en una siembra 0.1 g en 10 ml caldo MRS incubando a 37 °C por durante 24 h, periodo después del cual se toma 1ml más 9 ml de caldo MRS y se incuba a 37 °C por 6 h. De este último caldo con *L. casei* se realiza una siembra en agar MRS por el método de estrías y se incuba a 37 °C por 48 h.

### **Banco de células de trabajo**

Según la norma de la Organización Internacional de Normalización (2009) ISO/ST 11333-1:2009 los cultivos de reserva de la cepa de referencia son utilizados con propósitos de pruebas de rendimiento que deberán ser mantenidos y manejados de manera que minimicen los riesgos de contaminación cruzada, mutación o alteración de las características típicas. Los cultivos de reserva deben ser mantenidos en múltiples alícuotas, usualmente congelados (entre -20 y -70 °C) o liofilizado. A una temperatura mayor se reduce el tiempo de almacenamiento.

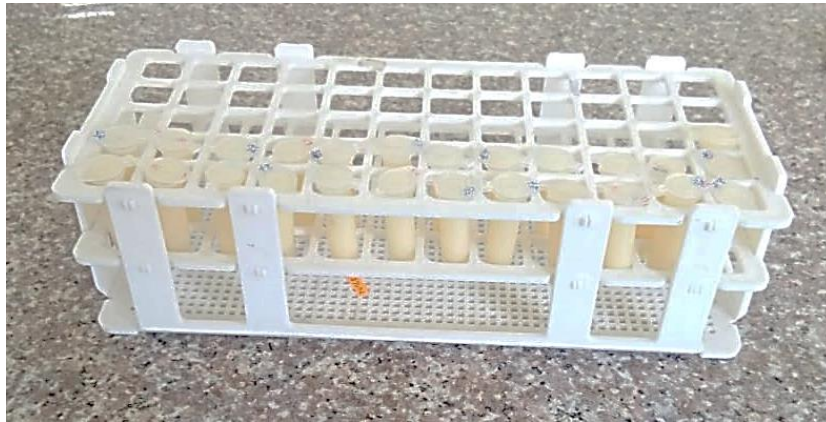
Los cultivos de reserva son usualmente preparados a partir de cultivos de referencia liofilizados o congelados. Las alícuotas deben manipularse de manera que se evite la posible contaminación cruzada del stock de referencia y / o su deterioro. Los cultivos de reserva deben prepararse suspendiendo una parte alícuota de cepa de referencia en un medio de crecimiento no selectivo e incubar para producir un cultivo en fase exponencial (ISO/ST 11333-1:2009).

Los cultivos de trabajo son preparados a partir de cultivos de reserva o de referencia.

El banco de trabajo de células consistió en dos etapas:

La primera fue la recuperación de la biomasa para lo cual se hizo una siembra en 100 ml de caldo MRS a partir de *L. casei* obtenidas de la revitalización, se incubó durante 24 h a 37°C, posteriormente se centrifugó a 4414 FCR durante 20 min en la centrífuga MPW-352R, se conservó el precipitado y se eliminó el sobrenadante.

La segunda etapa consistió en la adición de un agente crioprotector, en viales de 2 ml con un 15% de glicerol (figura 8) y se almacenaron en congelación de  $-10^{\circ}\text{C}$  (Parra et al., 2006).



**Figura 8.** Banco de células de trabajo

### **Pasteurización**

El lactosuero utilizado fue sometido a pasteurización, proceso térmico para reducir microorganismo no deseados, con parámetros de temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

### **Filtración**

Esta operación unitaria consiste en la eliminación de partículas sólidas o grumos de cuajada, mediante el uso de un tamiz para evitar que dichos cuerpos influyan u obstruyan el proceso de fermentación láctica.

### **Bioproceso**

Este proceso se llevó a cabo en el fermentador tipo discontinuo de vidrio con capacidad total de 5 L, el cual está debidamente equipado (control de temperatura por chaqueta, pH con bomba peristáltica y motor para agitación con turbina Rushton) Figura 9.



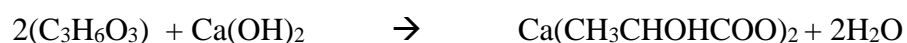
**Figura 9.** Biorreactor discontinuo utilizado.

El bioproceso consistió en la inoculación del biorreactor a partir de 50 ml de cultivo previamente activado por 24 h a 37 °C de un vial del BCT en 2 litros de sustrato (lactosuero) en condiciones anaeróbicos, durante el proceso se dejó caída libre del pH hasta alcanzar el valor del control según el tratamiento (debido a que la lactosa es metabolizada por *L. casei* y transformada en ácido láctico), para el control se utilizó  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al 2.5 N como agente neutralizante (Miller et al., 2011).

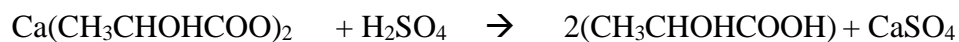
Para fines experimentales el bioproceso fue sometido a cinco niveles de temperaturas y cinco niveles de pH.

El ion lactato resultado del metabolismo de *L. casei* reacciona con el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  consumido durante la fermentación obteniendo así lactato de calcio representado en la siguiente ecuación:

a) Fermentación y neutralización



b) Hidrólisis por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Según Miller et al. (2011) 1 mol de Ca(OH)<sub>2</sub> equivale a 2 mol ácido láctico formado.

Para la recuperación de la molécula de ácido láctico se añadió ácido sulfúrico al 2,5 N que reacciona con el lactato de calcio formando sulfato de calcio y ácido láctico.

### **Centrifugación 1**

Consistió en la eliminación de biomasa mediante centrifugación a 2416 FCR durante 15 minutos, pues una vez finalizada el bioproceso, la biomasa y el lactato de calcio estaban disueltos en una misma solución.

### **Acidificación**

La acidificación consistió en la adición de ácido sulfúrico al 2.5 N que reaccionó con el lactato de calcio resultado de la adición de hidróxido de calcio durante la fermentación, de esta manera se recupera el ácido láctico, además se formaron sulfato de calcio sólido y ácido láctico disuelto (figura 10).



**Figura 10.** Sulfato de calcio sólido y ácido láctico (fuente el autor)

## **Centrifugación 2**

El sulfato de calcio en estado sólido resultantes del proceso anterior, fue separado por centrifugación a 2416 FCR durante 15 min (figura 11).



**Figura 11.** Sulfato de calcio formado

## **Ácido láctico**

El proceso concluye con la obtención de ácido láctico (figura 12) y su posterior caracterización mediante análisis físico-químicos.



**Figura 12.** Ácido láctico obtenido



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

El lactosuero antes de ser usado como sustrato en el bioproceso fue sometido a análisis físico-químicos de sólidos totales, proteína, lactosa, grasa, acidez y pH. Los resultados del análisis que se muestran en la tabla 12, se compararon con los valores establecidos en la norma NTE INEN 2594 (2011) de lactosuero de leche líquido, lo que permitió conocer las características del sustrato y su posterior clasificación.

**Tabla 12**

*Resultado de la caracterización de lactosuero*

Contenido de lactosuero	Resultados obtenidos	NTE INEN 2594 (2011)	
		Suero dulce	Suero ácido
Sólidos totales, % (m/m)	6.70	-	-
Lactosa, % (m/m)	4.70	4.40-5.00	≤4.30
Proteína láctea, % (m/m)	2.52	0.80	0.80
Grasa láctea, % (m/m)	0.04	0.30	0.30
Acidez titulable, % calculada como ácido láctico)	0.08	≤0.16	≥0.35
pH	6.5	6.8-6.4	5.5-4.8

Los valores obtenidos del lactosuero, presenta 6.71% de sólidos totales y de 4.7% de lactosa, este último es la principal fuente de carbono que será metabolizado por las bacterias ácido lácticas su desarrollo y conversión en ácido láctico (Buyukkileci y Harsa, 2004). La cantidad de proteína láctea y de acidez, según Pescuma et al. (2015) va a depender de diferentes factores como el tipo de lactosuero, fuente de leche, alimentación de los animales, tipo de procesamiento de queso, época del año y etapa de lactancia.

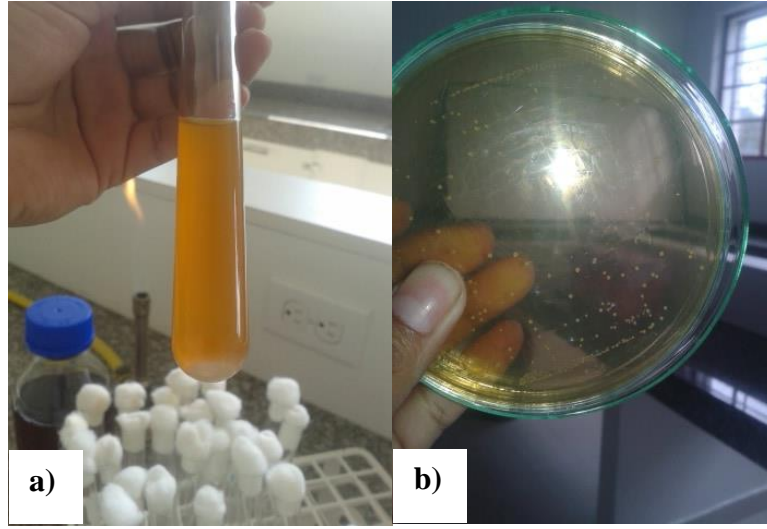
Dependiendo de la acidez y contenido de lactosa, el lactosuero de leche líquido se clasifica en dulce o ácido. En el lactosuero dulce el contenido de lactosa es superior y la acidez es menor comparado con el lactosuero ácido (NTE INEN 2594, 2011). El contenido de lactosa 4.7% es mayor a la que presenta el lactosuero ácido 4.3%, la acidez de lactosuero analizado es de 0.08 % siendo menor a 0.35 del lactosuero ácido y tiene un pH de 6.5 cuyo valor está dentro de los parámetros de suero dulce. Tsakali et al. (2010) clasifican al lactosuero como dulce cuando obtenga un pH mínimo de 5.6 y ácido cuando presenta un pH máximo de 5.1.

La importancia de trabajar con lactosuero dulce como sustrato se debe a que las bacterias ácido lácticas (*L. casei*) necesitan un medio óptimo en cuanto a la composición de nutrientes y condiciones físico-químicas apropiadas para su desarrollo afirman Granados y Villaverde (2007). El lactosuero dulce proporciona alto contenido de lactosa (fuente de carbono) es metabolizada por las bacterias para su desarrollo y generación de metabolitos. En el caso del *L. casei* produce estrictamente ácido láctico del isómero L(+) como producto final (Buyukkileci y Harsa, 2004).

## **4.2 DETERMINACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE TEMPERATURA Y pH QUE MAXIMICE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE ÁCIDO LÁCTICO**

### **Activación de *Lactobacillus casei* -01 liofilizada**

Las bacterias ácido lácticas (*L. casei*-01) liofilizadas fueron activadas (figura13), mediante el cultivo en caldo y agar MRS en un ambiente controlado, mostrando viabilidad y especificidad de la cepa; teniendo una media de crecimiento de  $2.63 \times 10^8$  UFC/ml.

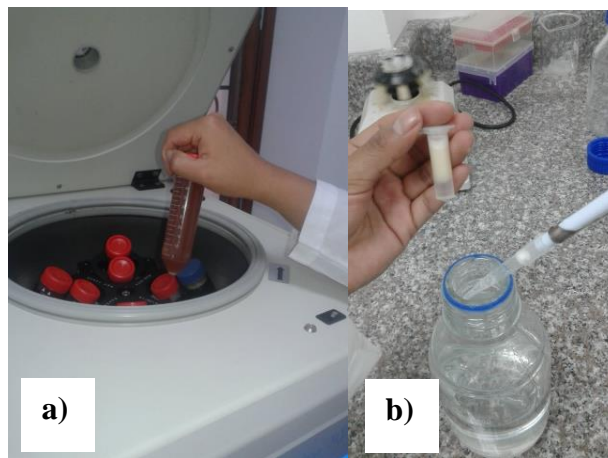


**Figura 13.** Activación de *L. casei*:

**Nota:** a) cultivo de 0.1 g de *L. casei* en 10 ml de caldo MRS por 24 h a 37 °C; b) cultivo en medio sólido, se incubó a 37 °C por 48 h.

### **Banco de trabajo de células**

Una vez obtenida la revitalización de las células, se procedió a la elaboración del banco de trabajo de células que garantiza la concentración estandarizada y homogenizada de biomasa al principio de cada tratamiento.



**Figura 14.** Recuperación de Biomasa

**Nota:** a) centrifugación a 4414 FCR por 20 minutos para separar la biomasa; b) adición de 15% de glicerina para su posterior conservación a -10 °C.

Se obtuvieron 25 viales (figura 14) con una concentración de biomasa del 1.71 % (m/v). En un banco de células es importante que los cultivos permanezcan puros y homogéneos bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética (Parra et al., 2006).

### **Bioproceso**

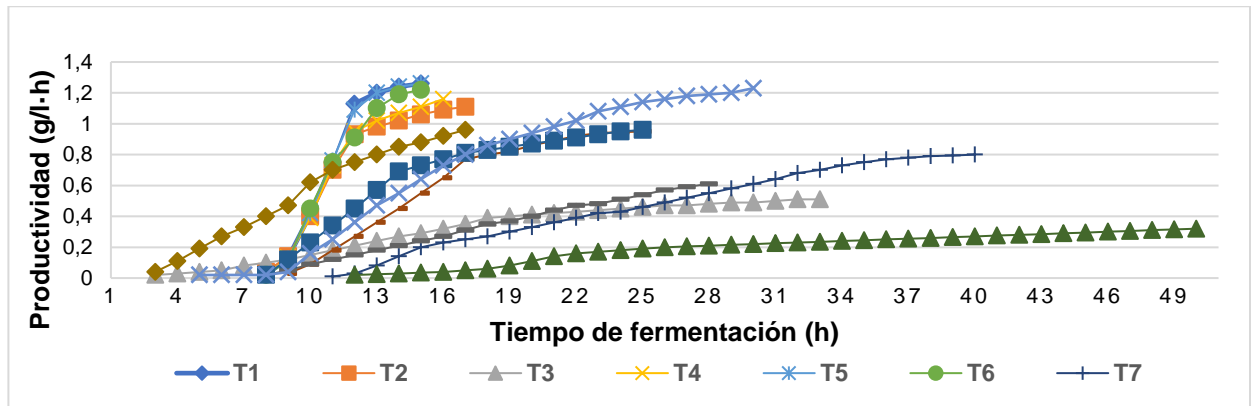
En cada bioproceso se fijaron los valores de pH y temperatura, para cada corrida y fueron controlados.

En cada tratamiento se mantuvo la agitación en 250 rpm para mantener la homogeneidad de los componentes y mejor control de pH y temperatura. El pH comenzó con un valor de 6.5, se dejó en caída libre hasta el valor de control y se mantuvo mediante la adición de hidróxido de calcio por un controlador automático, equipo que cuenta con un potenciómetro para medir los valores de pH y activar la bomba cuando éste lo amerite (figura 15).



**Figura 15.** Bioproceso utilizado en la obtención de ácido láctico.

Se tomó el valor más alto de productividad volumétrica de ácido láctico cuando finaliza la fase exponencial, los resultados obtenidos para cada tratamiento se pueden observar en la figura 16.



**Figura 16.** Cinética de la productividad de ácido láctico

En la Figura 16 muestra la cinética de la productividad volumétrica de ácido láctico. Debido a los diferentes niveles de factores en estudio (temperatura y pH) los tiempos de fermentación fueron diferentes, el comportamiento de la productividad volumétrica de los tratamientos 1, 2, 4, 5 y 6 fueron similares debido a que son las réplicas del punto central sugerido por el programa estadístico (37 °C y pH 5.5).

### Optimización de las condiciones de fermentación

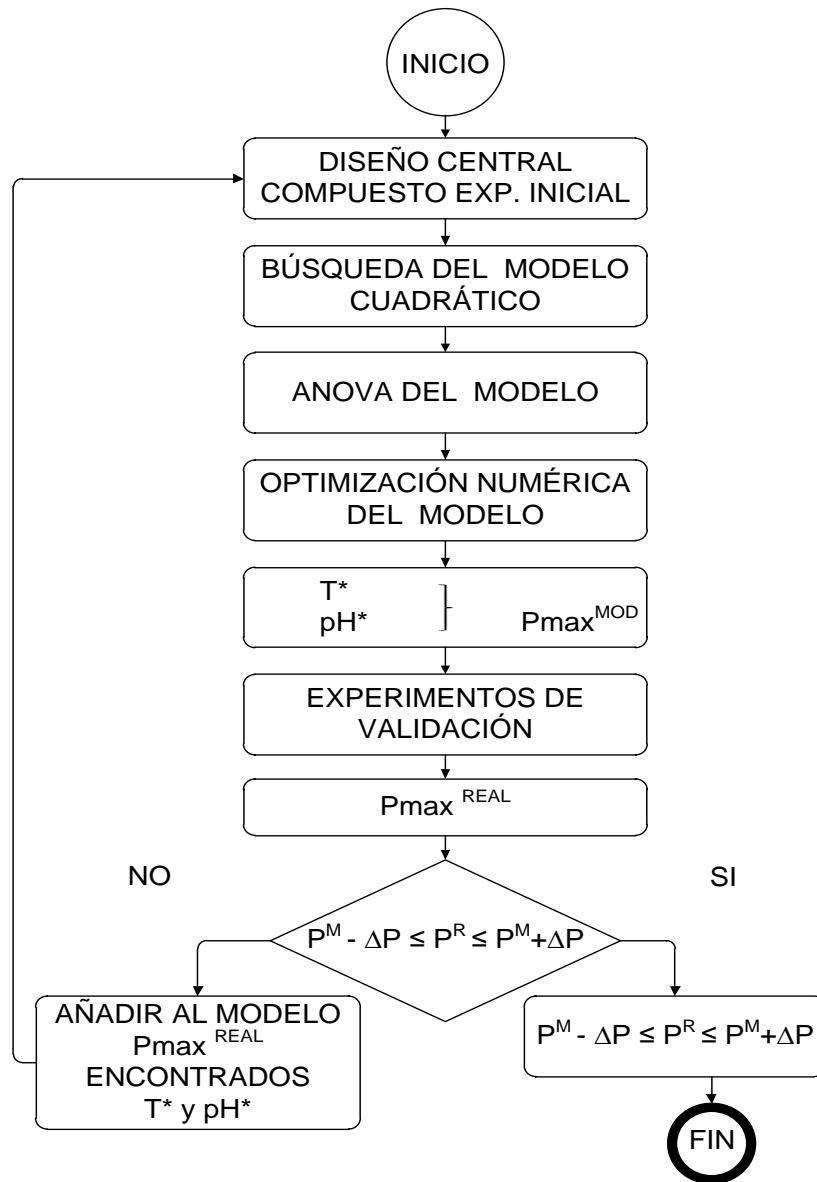
Al terminar con los experimentos propuestos se continuó con la búsqueda del punto óptimo que maximice la productividad volumétrica de ácido láctico, para lo cual se ingresaron los resultados obtenido resumidos en la tabla 13 de la variable de respuesta de cada tratamiento al programa *Desing Expert 11.0*.

**Tabla 13***Resultados obtenidos del bioproceso.*

<b>T</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentración (g/l)</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Productividad volumétrica (g/l·h)</b>
1	37.00	5.50	18.90	15.00	1.26
2	37.00	5.50	18.79	17.00	1.11
3	31.30	6.00	16.88	33.00	0.51
4	37.00	5.50	18.51	16.00	1.16
5	37.00	5.50	15.02	15.00	1.26
6	37.00	5.50	18.34	15.00	1.22
7	29.00	5.50	32.06	40.00	0.8
8	42.70	5.00	23.63	25.00	0.95
9	37.00	4.80	16.88	27.50	0.61
10	45.00	5.50	16.31	17.00	0.96
11	37.00	6.20	23.91	25.00	0.96
12	31.30	5.00	15.75	50.00	0.32
13	42.70	6.00	37.01	30.00	1.23

El cual proporcionó los datos del modelo, ANOVA y posibles combinaciones de variables independientes que cumplen con condiciones que optimice la productividad volumétrica del ácido láctico (figura 17).

Con la finalidad de determinar la mejor combinación de temperatura y pH que maximice la productividad volumétrica del ácido láctico se realizaron los tratamientos propuestos por el diseño experimental (tabla 9), mediante los valores reales encontrados de la variable de respuesta se ajustó y se validó debidamente el modelo, luego se procedió a explorar en la superficie descrita por el programa para encontrar la combinación óptima de niveles de los factores independientes que den como respuesta el punto óptimo para hallar la máxima productividad volumétrica.



**Figura 17.** Diagrama de proceso para la obtención de punto óptimo para la productividad de ácido láctico.

Los valores reales de la variable de respuesta se ajustaron a un modelo cuadrático para la productividad volumétrica del ácido láctico.

Los valores reales de respuesta de la variable dependiente se ajustaron a un modelo cuadrático para la productividad volumétrica de ácido láctico.

Los modelos de segundo orden usados para estimar la productividad volumétrica del ácido láctico, durante la fermentación fueron:

- Modelo de la variable de respuesta expresada en factores

$$P = +1,20 + 0,1970A + 0,1206B + 0,0225A*B - 0,1810A^2 - 0,2285B^2$$

Donde:

**P:** Productividad volumétrica del ácido láctico (g/l·h)

**A:** Variable codificada para temperatura (°C)

**B:** Variable codificada para pH

- Modelo de la variable de respuesta expresada en factores reales

$$P = -35,75 + 0,41*T + 10,21*pH + 0,008T*pH - 0,0056*T^2 - 0,93*pH^2$$

**Donde:**

**P:** productividad volumétrica del ácido láctico (g/l·h)

**T:** temperatura (°C)

La ecuación en factores de términos reales y codificados puede ser usada para hacer predicciones de la variable de respuesta, dados los niveles de cada factor.

**Análisis de varianza (ANOVA) de la variable de respuesta para la optimización estadística de la producción de ácido láctico**

**Análisis de varianza de modelo cuadrático**

En la tabla 14 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del modelo sugerido y el análisis estadístico de la variable de respuesta obtenido mediante la experimentación, el cual permitió conocer si el modelo estadístico sugerido es útil para determinar el punto óptimo para obtener la máxima productividad volumétrica de ácido láctico.



**Tabla 14**

Análisis de varianza del modelo cuadrático

<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>	<b>Significancia</b>
Modelo	0.954	5	0.1908	7.1	0.0114	***
A- Temperatura	0.3106	1	0.3106	11.56	0.0114	***
B-pH	0.1164	1	0.1164	4.33	0.0759	ns
A <sup>2</sup>	0.2279	1	0.2279	8.49	0.0226	***
B <sup>2</sup>	0.3632	1	0.3632	13.52	0.0079	***
Residuo	0.188	7	0.0269			
Falta de ajuste	0.1707	3	0.0569	13.17	0.0153	***
Error puro	0.0173	4	0.0043			
Total	1.14	12				

**Nota:** (\*\*\*) alta significancia; (ns) no existe significancia

En el análisis del ANOVA (tabla 14) para la productividad volumétrica de ácido láctico muestra que el valor p del modelo es  $< 0.05$  lo indica que es significativo, el término del efecto lineal de temperatura (A), el término del efecto cuadrático de la temperatura (A<sup>2</sup>) y pH (B<sup>2</sup>) también son significativos. Valores mayores a 0.1 indican que los términos del modelo no son significantes en este caso el pH (B).

$$S = 0.1639$$

$$\text{Media} = 0.9500$$

$$CV = 17.25 \%$$

$$R^2 = 0.8354$$

$$R^2 \text{ ajustado} = 0.7178$$

El coeficiente de determinación ajustado  $R^2$  ajustado es de 0.7178 lo que indica que el modelo utilizado en la búsqueda de la máxima productividad volumétrica del ácido láctico es satisfactorio ya que según Gutierrez y De la Vara (2008), si el modelo no muestra un mínimo de 0.70 del comportamiento de la respuesta en término de  $R^2$

ajustado, no se recomienda utilizar con fines de optimización ya que su predicción es mala.

Una vez verificados los resultados se procede a la validación del modelo que maximice la productividad volumétrica del ácido láctico.

### **Optimización y validación del modelo sugerido para la productividad volumétrica del ácido láctico**

Luego de haber realizado el análisis de Varianza (ANOVA) del modelo por Desing Expert 11.0, el mismo programa sugirió mas de una combinacione de niveles de los factores en estudio que cumplen con las condiciones de optimización, se escogió uno de ellos (tabla 15) con el fin de realizar la validación del modelo.

**Tabla 15**

*Condiciones óptimas para la productividad volumétrica de ácido láctico*

<b>Sugerencia</b>	<b>A: Temperatura (°C)</b>	<b>B: pH</b>
1	38.70	5.60
2	40.20	5.60
3	41.20	5.70

El bioproceso con las condiciones óptimas consistió en el crecimiento de *L. casei* a 40.2 °C y pH 5.6 durante las tres repeticiones del experimento de la validación. En promedio la productividad volumétrica de las 3 repeticiones fue igual a 1.27 g/l·h. Los resultados de productividad volumétrica con las condiciones óptimas (tabla 16) fueron:

**Tabla 16**

*Repeticiones del experimento con condiciones óptimas*

<b>Repeticiones</b>	<b>Productividad volumétrica (g/l·h)</b>
R1	1.27
R2	1.26
R3	1.27
Media	<b>1.27</b>

Luego de haber realizado los experimentos de validación los resultados de la variable de respuesta confirman el valor de la productividad predicha, ya que el valor real obtenido cae dentro de los rangos (1.10-1.40 g/l·h) que el programa señala como óptimos (tabla 17).

**Tabla 17**

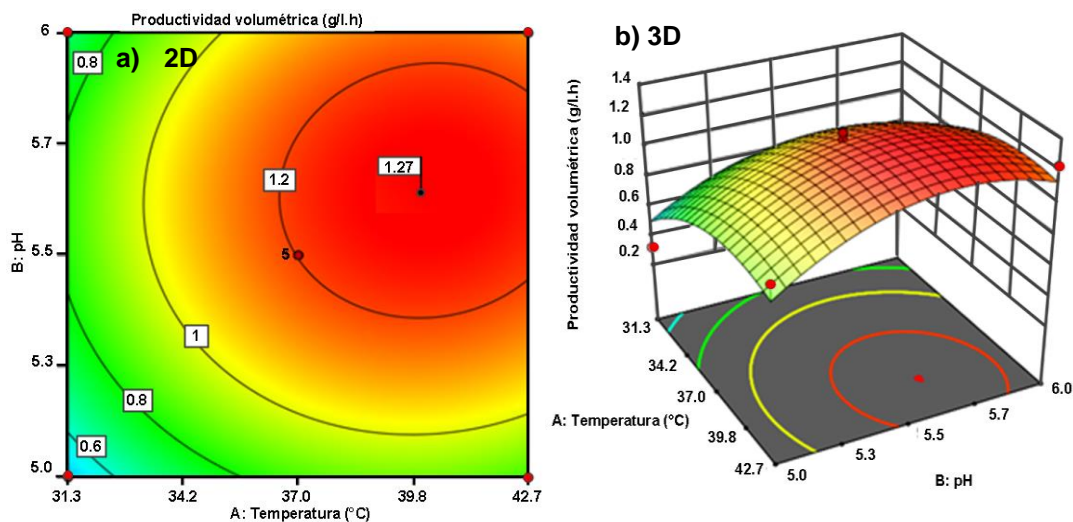
*Puntos predichos de productividad máxima con 95 % de Confianza*

Variable de respuesta	Observada	Baja	Alta
Productividad volumétrica (g/l·h)	<b>1.27</b>	1.10	1.40

Los valores óptimos de temperatura de 40.2 °C y pH de 5.6 obtenidos en este estudio confirman lo dicho por Singh, Ahmed y Pandey (2006) quienes afirman que las condiciones óptimas de producción de ácido láctico varían según las cepas de bacterias utilizadas, pero de forma general los valores de pH varían entre 5-7 y la temperatura de fermentación varían de 40 a 45 °C.

### Representaciones gráficas de puntos óptimos de la variable de respuesta

El programa estadístico *Desing Expert 11.0* proporcionó representaciones gráficas de los puntos óptimos, de temperatura y pH (figura 18).



**Figura 18.** Representación del punto óptimo de la productividad a) 2D y b) 3D

En la figura 18 a) y b) la zona roja representa los puntos óptimos de temperatura y pH que maximizan la productividad volumétrica del ácido láctico, es decir si tomamos cualquier punto dentro de esta zona el resultado de productividad volumétrica será el máximo; diferente es el caso de la zona de color anaranjado, verde y celeste, debido a que cuanto más alejado esté de la zona roja de puntos óptimos, más bajo será el valor de la productividad volumétrica.

En la tabla 18 se presentan productividades volumétricas de ácido láctico utilizando diferentes especies de *L. casei*, condiciones de sustrato, suplementos y condiciones de fermentación:

**Tabla 18**

*Comparación de Productividad volumétrica de ácido láctico con otros estudios en cultivos por lotes.*

Sustrato	Microorganismos	Suplemento	Condición	Productividad volumétrica (g/l·h)	Fuente
Lactosuero	<i>L. casei</i> NRRL B-441	E.L. y MnSO <sub>4</sub> 5.0 g/L	pH 5.5; 37 °C	1.84	Buyukkileci y Harsa (2004)
Lactosuero 50 g/l	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 39392	LMF; Glucosa: 80 g/l	pH 4.8-5; 42 °C; CI	0.63	Mirdabadi et al. (2008)
Lactosa (87.72) g/l	<i>L. casei</i> ATCC 393	Sulfato de amonio 5 g/l	37 °C; pH inicial 6.5	1.06	García et al. (2013)
Lactosuero	<i>L. casei</i> -01	NS	pH 5.6; 40.2 °C	<b>1.27</b>	Este estudio

\*E.L.: Extracto de levadura; LMF: Licor de maíz fermentado; CI: Células inmóviles; NS: no suplementada

Se puede observar (Tabla 18) que la productividad volumétrica del ácido láctico de 1.84 g/l·h es la más alta, esto puede ser debido al uso de suplemento en el sustrato empleado con extracto de levadura y con sulfato de manganeso, que sirven como fuentes de nutrientes para las bacterias ácido lácticas utilizadas en el estudio, seguida de la productividad volumétrica de 1.27 g/l·h del presente trabajo, se debe aclarar que no se utilizó suplemento como en el caso anterior, ya que se quería evaluar la

profundidad nutricional del lactosuero utilizado, aunque, Según García et al. (2013) aseguran que al suplementar con una fuente de nitrógeno se mejora la velocidad de bioconversión, lo que quedaría por demostrar la factibilidad económica con el uso de suplementos.

Mirdabadi et al. (2008) y García et al. (2013) señalan que el crecimiento de *L. casei* en el cultivo está directamente relacionado con la concentración de lactosa, en su estudio obtuvieron el mayor crecimiento de 8.39 log UFC.ml<sup>-1</sup> a 87.72 g/l de lactosa inicial, aunque fue la menor conversión de ésta y describen que existe una mayor predisposición del medio para el crecimiento del *L. casei* que para la formación del ácido láctico. Esto podría explicar la razón por la cual los lactosueros con mayor concentración o suplementación de lactosa obtuvieron menor productividad volumétrica de ácido láctico.

#### **4.3 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS**

El ácido láctico obtenido de la mejor combinación de los parámetros del proceso: temperatura 40.2 °C y pH 5.6, se sometió a un proceso de evaporación; después de mantener el volumen constante se midieron las variables que se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19**

*Características físico-químicas del ácido láctico obtenido*

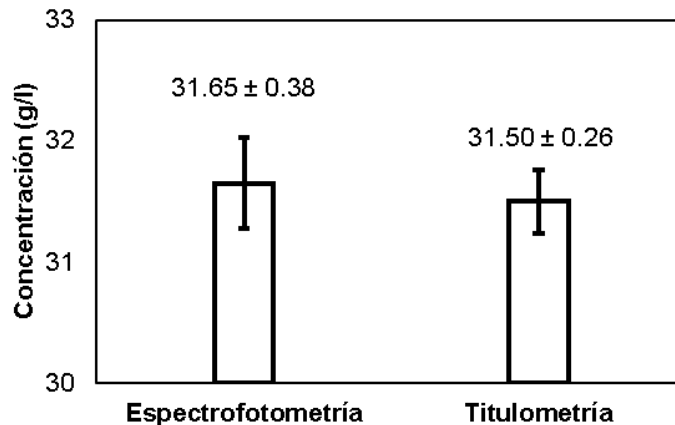
<b>ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICOS</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>ÁCIDO LÁCTICO 88 %</b>
Color	Amarillo transparente	Amarillo transparente
Densidad a 20 °C	1.10 g/ml	1.19 - 1.21 g/ml
pH	3.1	-
Concentración	31.65 g/l	-
Acidez titulable	3.2%	88.0%
Solubilidad	Agua y etanol	agua y etanol

El ácido láctico obtenido (figura 19) en cuanto a solubilidad y color es similar al comercial presentó un color amarillo transparente, las demás variables como densidad de 1.10 g/ml y concentración 3.2% son diferentes esto puede estar debido que se necesitaría de un paso de purificación secundaria para aumentar la pureza como lo recomienda (Weiwei Z. et al 2019).



**Figura 19.** Ácido láctico obtenido

Para comprobar que los valores de concentración de ácido láctico obtenido en el producto final son confiables se comparó con otra técnica usada en el estudio de (Borshchevskaya et al., 2016) que utilizó el método espectrofotométrico que es más específico y se comparó con la titulación.



**Figura 20.** Comparación de los resultados de la determinación de ácido láctico (g/L) por el método espectrofotométrico y titulación.

En la figura 20 se presentan la comparación de resultados en ambos métodos utilizados para medir la concentración del ácido láctico obtenido. El valor por espectrofotometría es  $31.65 \pm 0.38$  y por titulometría  $31.50 \pm 0.26$ , no presentaron diferencia significativa para un  $p < 0.05$ , por lo que, estadísticamente son iguales, se puede asegurar que los dos métodos espectrofotométrico y titulación son válidos para la medición de la concentración ácido láctico. Esto es un resultado interesante ya que Borshevskaya et al., (2016) en sus estudios comparó el método de cuantificación de ácido láctico espectrofotométrico y el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), este último es un método muy específico y costoso, demostrado que no existieron diferencias significativas entre ellos, lo que se podría asumir que la técnica de titulación realizada en este estudio es confiable.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- El lactosuero utilizado presentó alto contenido de lactosa (4.70%), pH de 6.5 cercano a la neutralidad y baja acidez (0.08%), que lo clasifican como suero dulce, estos valores lo sitúan con gran potencial para ser usado como sustrato en procesos de fermentación.
- La combinación de temperatura y pH que maximiza la productividad volumétrica de ácido láctico es de 40.2 °C y pH 5.6, condiciones con las cuales se alcanzaron valores de 1.27 g/l·h, en un bioproceso por lote utilizando lactosuero dulce.
- El ácido láctico obtenido es aceptable por su color amarillo transparente con densidad de 1.10 g/ml y se clasifica como ácido láctico crudo por su baja concentración.
- Se acepta la hipótesis alternativa ya que se demostró por modelos matemáticos que los parámetros cinéticos de temperatura y pH influyen sobre la productividad volumétrica de ácido láctico, utilizando lactosuero dulce y *Lactobacillus casei*.



## **5.2 Recomendaciones**

- Realizar estudios de factibilidad para la obtención de ácido láctico con lactosuero suplementado.
- Determinar la carga de contaminante de los residuos generados en este estudio.
- Realizar estudios del proceso de purificación para aumentar la pureza del ácido láctico.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2013). *Farmacopea Argentina*. Buenos Aires, Argentina.

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, México.

Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC 925.23, 1925). *Método oficial para la determinación de sólidos totales en la leche*.

Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC 960.16, 1961). *Método oficial para la determinación de grasa láctea*.

Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC 947.05, 1990). *Método oficial para la determinación de acidez titulable*.

Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC 991.20, 1994). *Método oficial para la determinación de proteína*.

Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC 973.41, 1998). *Método oficial para la determinación de pH*.

Asociación Internacional de Químicos Analíticos (AOAC 984.15, 2012). *Método oficial para la determinación de lactosa*.

Banco Central de Ecuador (2017). Importaciones de insumos químicos. SINAGAP (Coordinación General del Sistema de Información Nacional). Recuperado de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/importaciones-y-exportaciones-bce>

- Barba, A. y Clausell, C. (2014). *Reactores químicos y bioquímicos*. Castellón de la Plana, España. Universitat Jaume I. Servei de Comunicació i Publicacions.
- Borshchevskaya, L., Gordeeva, T., Kalinina, A. y Sineokii, S. (2016). Spectrofotometric determination of acid lactic. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), 787-790.
- Buyukkileci A., & Harsa, S. (2004). Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1036-1040.
- Centro de la Industria Láctea. (2019). *Bases convocatorias al reto de innovación abierta "Alternativas utilización de suero de leche"*. Recuperado de <https://www.cilecuador.org/noticias-2/plataforma-de-trabajo-del-sector-lechero-1>.
- Collins, M., Phillips, B., y Zannoni, P. (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. paracasei and ssp. tolerans, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. systematic Bacteriology*, 39(2), 105-108.
- Datta, R., & Tsai, S.P. (1997). Lactic acid production and potential uses: a technology and economics assesment. *ACS symposium series; American Chemical Society*, 666(12), 225.
- Disck, L., Plessis, D., Dellaglio, F., & Lauer, E. (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. casei ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. casei, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 337.

- Galactic. (2019). Galacid-Ácido Láctico. Recuperado de <https://www.lactic.com/es-es/soluciones/nuestrassoluciones/galacid%e2%84%a2.aspx>
- García, M., Arrázola, P. y Villalba, C. (2013). Production of lactic acid with supplemented whey using *Lactobacillus casei*. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 137-142.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aquil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. y Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciencies*, 7, 223-228.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal San Miguel de Ibarra. (2017). Condiciones climatográficas. Recuperado de [www.ibarra.gob.ec](http://www.ibarra.gob.ec)
- Granados, R. y Villaverde, C. (2007). *Bacteriología, medios de cultivo y pruebas Bioquímicas*. Madrid (España). Ediciones Paraninfo S.A.
- Gutiérrez, H. y De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- James, H. (2015). *Ácido láctico. Encyclopedia of Astrobiology*. Tokyo-Japan. Springer-Verlang Berlin Heidelberg.
- Merck, K. (2013). *Reactivos y Productos Químicos*. Germany: Darmstadt.
- Miller, C., Fosmer, A., Rush, B., MnMullin, T., Beacom, D., y Souminen, P. (2011). *Industrial production on lactic acid*. Minneapolis-USA. Elsevier B.V. 179-187
- Mirdabadi, S., Atashgahi, S., Rajabi, A., Aziz-Mohseni, F., Roayaei, M. y Hamedi, J. (2008). Cell entrapment of *Lactobacillus casei subsp. casei* ATCC 39392 for lactic acid production. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6(1), 16-21.

Mohanty, J., Das, P., Nanda, S., Nayak, P., y Pradhan, P. (2015). Comparative analysis of crude and pure lactic acid produced by *Lactobacillus fermentum* and its inhibitory effects on spoilage bacteria. *The Pharma Innovation Journal*, 3 (11), 38-40.

Mori, K., Yamazaki, K., Ishimaya, T., Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y., Inoue, N. y Shinano, H. (1997). Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of urutan, a Balinese indigenous fermented sausage. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (1), 54-57.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. y Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), 167-179.

NTE INEN 12 (1973). Leche. Determinación de grasa láctea.

NTE INEN 14 (1983). Leche. Determinación de ceniza.

NTE INEN 11 (1984). Leche. Determinación de densidad relativa

NTE INEN 13 (1984). Leche. Determinación de acidez titulable.

NTE INEN 1529-1 (1999): Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos.

NTE INEN 2594 (2011): Suero de leche líquido. Requisitos.

NTE INEN 16 (2015): Leche. Determinación de proteína láctea.

Organización Internacional de Normalización (2009). ISO/ST 11333-1, Microbiology of food and animal feeding stuff-Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. Switzerland-Suiza.

- Páez G., Pérez A., Araujo K., Mármol Z. y Rincón M. (2012). Efecto de la concentración de lactosa sobre la producción de  $\beta$ -D-galactosidasa a partir de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554 en cultivo por lote alimentado. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología*, 32(1), 50-54.
- Palacios K., Álcivar L., Pico C., Posligua G., Romero M., Rosero E., (2019). Diseño de un biorreactor para la obtención de ácido acético a partir del vino de mucílago de cacao (*Theobroma cacao*). *Revista de Ciencias Agropecuarias ALLPA*, 1(1), 51-61. 2019.
- Parra, S., Pérez, M., Morales, M., Suárez, Z. y Montoya, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*, 4(5), 39-49.
- Pescuma, M., Font de Valdez, G., y Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99 (15), 6183-6196.
- Petrov, K., Petrova, P., y Boschkov, V. (2007). Improved immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in polyacrylamide gel, preventing cell leakage during lactic acid fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (3), 423-428.
- Piassi, M., Fontes, L., Sass, D., y Contiero, J. (2016). L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 640-646.
- Poutou, R., Martínez, E., y Frontela, M. (1994). Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud*, 11(1), 55-59.

- Reddy, C., Henderson, H., y Erdman, M. (1976). Bacteria fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(6), 769.
- Rodríguez A., Cabrera, A. y Valencia, J. (2003). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 24(1), 56-59.
- Rodríguez, S., Giraldo, G. y Montes, L. (2016). Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información Tecnológica*, 27(6), 135-144.
- Ruiz, J. (2017). *Ingeniería de bioprocesos II*. México: Issuu Inc.
- Singh, S., Ahmed, S., y Pandey, A. (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. En Boudrant, J., Sinskey, A. y Zhong J. (Ed.), *Process Biochemistry* (pp. 991-1000). Florida, United States of America. Elsevier B.V. All rights reserved.
- Suh, H. y Rodríguez, E. (2017). Determinación del pH y contenido total de azúcares de varias bebidas no alcohólicas: su relación con erosión y caries dental. *ODONTOINVESTIGACIÓN*.
- Tsakali, E., Petrotos, K., D`Alessandro, A., y Panagiotis, G. (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. *6th international conference on simulation and modeling in the food and bio-industry*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/281839469\\_A\\_review\\_on\\_whey\\_composition\\_and\\_the\\_methods\\_used\\_for\\_its\\_utilization\\_for\\_food\\_and\\_pharmaceutical\\_products](https://www.researchgate.net/publication/281839469_A_review_on_whey_composition_and_the_methods_used_for_its_utilization_for_food_and_pharmaceutical_products).

Thongchul, N. (2013). Production of lactic acid and polylactic acid for industrial applications. En Yang, S., El-Enshasy, H. y Thongchul, N. (Ed.), *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers* (pp. 293-316). New Jersey, United States of America. John Wiley & Sons.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., y Woolverton, C. J. (2009). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. Madrid, España: McGraw-Hill.

Weiwei Z., Keyu Z., Xiulian R., Qifeng W., Recovery and separation of lactic and malic acids from fermentation broth with N,N,N,N-Tetrabutylbutanediamide by reactive liquid-liquid extraction and stripping (2019) *Journal of Food Science & Technology* 4(8) p:934-945.