



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

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

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE
LACTOSUERO SUPLEMENTADO UTILIZANDO *Lactobacillus
casei* MEDIANTE FERMENTACIÓN CONTINUA**

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

Autor: ERIKA ESTEFANÍA GÁLVEZ CADENA

Director: Ing. Jimmy Núñez Pérez, MSc.

Ibarra- Ecuador

2021



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
“OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO
SUPLEMENTADO UTILIZANDO *Lactobacillus casei* MEDIANTE
FERMENTACIÓN CONTINUA”

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

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

APROBADA:

FIRMA

Ing. Jimmy Núñez, MSc.
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Holguer Pineda, MBA.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Jimmy Cuarán, Mg.I
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

- 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:	0401791330-0		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Gálvez Cadena Erika Estefanía		
DIRECCIÓN:	La Libertad- Carchi- Espejo		
EMAIL:	eegalvezc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	2212120	CELULAR:	0989502649

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	"OBTENCIÓN DE ACIDO LACTICO A PARTIR DE LACTOSUERO SUPLEMENTADO UTILIZANDO <i>Lactobacillus casei</i> MEDIANTE FERMENTACIÓN CONTINUA"
AUTOR (ES):	Gálvez Cadena Erika Estefanía
FECHA: DD/MM/AA	13/12/2021
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, MSc.

- CONSTANCIAS

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

Ibarra, a los 13 días del mes de diciembre de 2021.

EL AUTOR:


.....
Erika Estefanía Gálvez Cadena

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Erika Estefanía Gálvez Cadena, con cédula de ciudadanía N° 040179133-0 bajo mi supervisión.



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

AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero agradecer a todos los que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron conmigo en los momentos difíciles, alegres, y tristes.

Principalmente a Dios por permitirme vivir esta maravillosa etapa de vida, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente en todo momento.

A mis padres, Isabel y Pedro por ser los promotores de mis sueños, por confiar y creer en mí, gracias porque con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible, gracias a ustedes soy una persona llena de valores y principios.

A mis hermanitas gracias por sus consejos, su ejemplo y su amor incondicional fueron y serán una fuente de inspiración por la perseverancia y dedicación cuando quieren alcanzar sus sueños.

Gracias infinitas familia Gálvez Cadena...

Agradezco a todos los docentes de la Universidad Técnica del Norte que, con su sabiduría, conocimiento y apoyo, permitieron desarrollarme como persona y profesional, en especial a mi tutor Ing. Jimmy Núñez y asesores Ing. Jimmy Cuarán e Ing. Holguer Pineda quienes desde el primer momento me brindaron su amistad, su bondad, su guía, paciencia, y por compartir sus conocimientos y tiempo, a lo largo del desarrollo de esta investigación y permitirme concluir con una etapa más de mi vida.

En el camino encuentras personas que iluminan tu vida, que con su apoyo alcanzas de mejor manera tus metas, a través de sus consejos, de su amor, y paciencia concluí esta meta, gracias amigos los llevaré en mi corazón: J.I, J.M, S.P, D.G, I.E, M.R, J.S, D.C, S.Y, N.A, A.G, K.CH, S.CH, N.M, V.V, F.J, K.L, N.B, D.E y a todos quienes contribuyeron con un granito de arena para culminar con éxito la meta propuesta.

Esteffy

DEDICATORIA

Este logro académico se lo dedico:

A mis padres por darme su apoyo, guía, comprensión, paciencia y amor en todo momento, en especial a ti mi ángel terrenal, mi hada madrina, mi confidente, mi cómplice, mi amiga, por guiarme, por ayudarme a crecer, por amarme, por sostener mi mano siempre y más en los días malos, pero sobre todo por nunca cortarme las alas para cumplir mis sueños y anhelos, a ti mamita.

A mis hermanas Anita, MaFer y Rosita por su guía, apoyo, amor y confianza incondicional en todo momento.

A mi ángel celestial que desde el cielo cuida de mí, a pesar de que no estás ahora conmigo, sé que tu alma si lo está y porque querías verme alcanzar mis sueños, tú muñequita te dedica con todo el corazón su tesis. Vivirás siempre en mi corazón abuelito.....

Esteffy

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN.....	iii
SUMMARY	iv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 OBJETIVOS	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 HIPÓTESIS	4
1.4.1 Hipótesis Nula	4
1.4.2 Hipótesis Alternativa	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Industria Láctea en el Ecuador	5
2.2 Lactosuero	5
2.2.1 Tipos de lactosuero y composición nutricional	6
2.2.2 Usos del lactosuero	7
2.3 Medios de cultivo utilizados para la producción de Ácido Láctico.....	8
2.3.1 Lactosuero como medio de cultivo.....	10
2.4 Ácido Láctico	10

2.4.1 Usos del Ácido Láctico.....	12
2.5 Microorganismos para la producción de Ácido Láctico.....	13
2.5.1 Bacterias Ácido Lácticas	14
2.5.2 Características de la bacteria ácido láctica <i>Lactobacillus casei</i>	15
2.5.3 Factores que afectan al crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> y la eficiencia en la producción de ácido láctico.....	16
2.6 Suplementos.....	18
2.7 Sistemas de Fermentación	19
2.7.1 Fermentación Continua.....	20
2.7.2 Fermentación por Lotes	21
2.7.3 Fermentación Semicontinua	22
2.7.4 Fermentación en Perfusión	22
2.8 Optimización	22
CAPÍTULO III.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Caracterización del área de estudio	23
3.1.1 Localización del Experimento	23
3.2 Materiales y Equipos	24
3.2.1 Materia prima e insumos	24
3.2.2 Equipos	24
3.2.3 Materiales	25
3.3 Metodología.....	25
3.3.1 Establecer la cinética de fermentación mediante la ecuación de crecimiento para determinar el tiempo y velocidad	28

3.3.2 Determinación de los parámetros de fermentación, Productividad y rendimiento para la obtención de ácido láctico.....	30
3.3.3 Optimización de las variables del proceso para maximizar la productividad.....	30
3.4 Manejo específico del experimento.....	31
CAPÍTULO IV.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 Establecer la cinética de fermentación mediante la ecuación de crecimiento para determinar el tiempo y la velocidad específica	35
4.2 Determinación de los parámetros de fermentación, productividad y rendimiento para la obtención de ácido láctico.....	36
4.3 Optimización de las variables del proceso para maximizar la productividad.....	38
CAPÍTULO V.....	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
5.1 Conclusiones.....	44
5.2 Recomendaciones	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del lactosuero.....	6
Tabla 2. Composición nutricional del lactosuero.....	7
Tabla 3. Producción de ácido láctico a partir de sustratos puros glucosa y lactosa	9
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.....	11
Tabla 5. Concentraciones de ácido láctico	11
Tabla 6. Microorganismos utilizados en investigaciones recientes sobre la producción biotecnológica de ácido láctico	13
Tabla 7. Bacterias del ácido láctico homo y heterofermentativo y configuración del ácido láctico	14
Tabla 8. Localización del experimento	23
Tabla 9. Factores y niveles estadísticos	26
Tabla 10. Descripción de los tratamientos	26
Tabla 11. Variables experimentales	27
Tabla 12. Parámetros cinéticos calculados en cultivos por lotes para <i>L. casei</i> - 01	35
Tabla 13. Parámetros cinéticos calculados en el estado estacionario para <i>L. casei</i> - 01.....	36
Tabla 14. Valores de productividad volumétrica, rendimiento producto – sustrato a distintos factores de dilución.....	38
Tabla 15. Productividad volumétrica de ácido láctico a diferentes condiciones de cultivo.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Usos y aplicaciones comerciales del ácido láctico	12
Figura 2. Modo de operación de birreactores	20
Figura 3. Diagrama de proceso	31
Figura 4. Revitalización de la cepa <i>L. casei</i> - 01 a) Cepa liofilizada <i>L. casei</i> - 01, b) Activación del microorganismo medio MRS, c) Siembra en placa medio sólido MRS	32
Figura 5. Adaptación del microorganismo medio MRS	33
Figura 6. Banco de células <i>L. casei</i> - 01	33
Figura 7. Proceso de fermentación.....	34
Figura 8. Factor óptimo de dilución para la productividad volumétrica de ácido láctico	39
Figura 9. Valores predichos vs observados de productividad volumétrica de ácido láctico	40
Figura 10. Valores predichos vs residuos	40
Figura 11. Factor óptimo de dilución para el rendimiento $Y_{p/s}$ de ácido láctico .	41
Figura 12. Valores predichos vs observados de rendimiento producto – sustrato de ácido láctico	42
Figura 13. Valores predichos vs residuos	42

RESUMEN

La conservación del medio ambiente es un tema de gran interés social por el cual se busca impulsar a las industrias a la utilización de los residuos agroindustriales como sustrato a través de procesos de biotransformación. El objetivo en este estudio fue obtener ácido láctico a partir de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei* mediante fermentación continua. El lactosuero fue previamente pasteurizado a 60 °C por 15 minutos y suplementado e inoculado con *L. casei*, se tomaron en cuenta como variables de estudio el sustrato (suero dulce, suero dulce con extracto de levadura, suero dulce con sulfato de amonio y peptona) y temperatura de fermentación (29, 37, 45 °C) para encontrar las condiciones del proceso que permitan maximizar la productividad volumétrica de ácido láctico en el estado estacionario, para el análisis de datos se utilizó el programa *Statgraphics Centurion* 16.1. Se realizaron 9 corridas experimentales y 4 repeticiones del tratamiento con mejores resultados. Se determinó que las condiciones que permiten la maximización de la productividad volumétrica del metabolito fue, suero dulce suplementado con sulfato de amonio y peptona a temperatura de 37 °C, alcanzando valores máximos de 3.17 g·L⁻¹h⁻¹ con factor de dilución de 0.57 h⁻¹. Concluyendo que el lactosuero mostró ser un sustrato potencial para la producción de ácido láctico, al ser suplementado presentó mejor productividad volumétrica comparable con otros datos reportados en la literatura.

Palabras clave: fermentación continua, *Lactobacillus casei*, lactosuero, suplementos, estado estacionario.

SUMMARY

The conservation of the environment is a topic of great social interest for which it seeks to encourage industries to use agro-industrial waste as substrate through biotransformation processes. The objective in this study was to obtain lactic acid from supplemented whey using *Lactobacillus casei* by continuous fermentation. The whey was previously pasteurized at 60 °C for 15 minutes and supplemented and inoculated with *L. casei*, the variables under study were substrate (sweet whey, sweet whey with yeast extract, sweet whey with ammonium sulfate and peptone) and fermentation temperature (29, 37, 45 ° C) to find the process conditions that maximize the volumetric productivity of lactic acid at steady state, using the program (*Statgraphics Centurion 16.1*). Were made 9 experimental runs and 4 repetitions of the best treatment. The best conditions that maximize the volumetric productivity of the metabolite were sweet whey supplemented with ammonium sulfate and peptone at a temperature of 37 ° C, reaching maximum rate of volumetric productivity of 3.17 g·L⁻¹h⁻¹ with dilution factor of 0.57 h⁻¹. Concluding that whey is a potential substrate for the production of lactic acid and when supplemented it presented better volumetric productivity comparable with other results reported in the literature.

Key words: continuous fermentation, *Lactobacillus casei*, whey, supplements, steady state.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMA

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la actividad económica y laboral del Ecuador, según el INEC (2021) de los 6.152.841 litros de leche producidos en el país diariamente, 76,46% es vendida en líquido, 12,40% es procesada en terrenos, 8,52% consumo en los terrenos, 2,40% alimentación al balde y 0,23% destinada a otros fines.

El lactosuero es el principal subproducto de la elaboración de quesos, representa una fuente rica de nutrientes como son la lactosa, el ácido láctico, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Williams & Dueñas, 2021; Panesar et al., 2007). El lactosuero se ha considerado por años como un desecho sin valorización alguna, en su mayoría es empleado en alimentación animal, o desechado y requiere ser tratado en las plantas de residuales de las industrias, provocando gastos por su alta concentración de lactosa para ser degradada. Genera un impacto ambiental negativo al ser vertido directamente a las fuentes naturales de agua debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO), principalmente causada por la lactosa (azúcar de la leche) (Muñi, Paez et al., 2005; Pescuma et al., 2015).

Actualmente la demanda de ácido láctico está aumentando, debido a sus múltiples aplicaciones en el campo alimentario y no alimentario, forma parte de las importaciones del Ecuador (Banco Central del Ecuador, 2017).

La falta de aprovechamiento del lactosuero en las empresas lecheras del Ecuador se genera por la poca investigación sobre los productos que se pueden obtener mediante procesos óptimos fermentativos de este mediante el uso de microorganismos específicos (Aspasia et al., 2012).

1.2 JUSTIFICACIÓN

El lactosuero al ser un residuo agroindustrial abundante y rico en nutrientes proveniente de las industrias lácteas se convierte en importante darle mayor valor agregado.

Para transformar el lactosuero a bioproductos y darle un valor agregado, existen diversos procesos entre los que se considera la fermentación como una alternativa económica, debido a los costos que este representa. Dentro de la gama de productos útiles obtenidos mediante un proceso fermentativo, se encuentra el ácido láctico que está formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, conformando dos isómeros ópticos, el D (-) láctico y el L (+) láctico. El isómero D (-) es perjudicial al metabolismo humano y puede generar acidosis. El isómero L (+) láctico es clasificado por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos) como una sustancia GRAS (generalmente reconocido como seguro) para uso como aditivo alimenticio (García et al., 2010). El mercado de ácido láctico ha tenido un aumento progresivo en los últimos años, tanto por su importancia en la industria cosmética, textil, química, farmacéutica, alimenticia, como en la aplicación de nuevas tecnologías como la producción de biopolímeros (Christensen et al., 2008).

El presente estudio tiene como finalidad la implementación de un bioproceso usando el lactosuero como materia prima y la cepa *Lactobacillus casei* para el proceso de fermentación y suplementos que permitan generar altas concentraciones de ácido láctico y, por tanto, mayor productividad y constituya un ingreso más a la industria que a diferencia de la actualidad representa un contaminante y un gasto en el tratamiento de residuos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener ácido láctico a partir de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei* mediante fermentación continua.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la cinética de fermentación mediante la ecuación de crecimiento para determinar el tiempo y la velocidad específica.
- Determinar los parámetros de fermentación, productividad y rendimiento para la obtención de ácido láctico.
- Optimizar las variables del proceso para maximizar la productividad.

1.4 HIPÓTESIS

1.4.1 HIPÓTESIS NULA

H₀: Los suplementos utilizados en el lactosuero no influyen en el proceso de generación de ácido láctico mediante una fermentación continua.

1.4.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

H_a: Los suplementos utilizados para el lactosuero influyen en el proceso de generación de ácido láctico mediante una fermentación continua.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 INDUSTRIA LÁCTEA EN EL ECUADOR

En Ecuador la industria láctea es sin duda uno de los sectores más importantes de la economía nacional, tanto en lo referente a la generación de empleo directo e indirecto, valor agregado y espacio territorial (Carrillo, 2016). La producción nacional de este recurso es de 6.152.841 L de leche/día, de los cuales el 77,2 % provienen de la región Sierra, 17,9 % de la región Costa, 4,8 % de la región Amazónica (INEC, 2021).

Aproximadamente el 85% del total de la leche utilizada para la fabricación de queso se descarta como suero. El suero retiene aproximadamente el 55% de los nutrientes totales de la leche entre los nutrientes más abundantes se encuentran la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Aunque se han explorado varias posibilidades de utilización de suero de queso, una parte importante se descarta como efluente. Su eliminación como desecho plantea serios problemas de contaminación para el medio ambiente (González, 2012).

2.2 LACTOSUERO

El suero es el líquido residual de la transformación de la leche en queso. Es el subproducto más abundante en las industrias lácteas. El suero es un producto muy

utilizado en el campo de la alimentación animal (hasta un 20% en peso del alimento), en la fabricación de algunos tipos de bebidas y de alimentos enriquecidos para el hombre. Desde el punto de vista nutricional la proteína presente en el suero es el componente más valioso, contiene también las vitaminas y minerales no retenidos en el proceso de coagulación de la leche y lactosa, de gran uso en la industria farmacéutica y alimenticia. Sin embargo, la cantidad de suero que se aprovecha es muy poca comparada con su producción (Zambrano & López, 2018).

La eliminación del lactosuero se debe entre otros aspectos, al desconocimiento de algunos productores sobre las bondades nutricionales de este subproducto y a la dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento; también, a limitaciones en la regulación alimentaria que permitan la apropiada utilización como ingrediente alimenticio (Ganju & Gogate, 2017).

2.2.1 TIPOS DE LACTOSUERO Y COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

Según Ramírez (2012), de acuerdo con su origen se clasifica en:

- **Lactosuero dulce:** líquido sobrante de la precipitación de las proteínas por hidrólisis específica de la K-caseína, por coagulación enzimática, con pH próximo al de la leche inicial y sin variación de la composición mineral.
- **Lactosuero ácido:** líquido sobrante obtenido después de la coagulación ácida o láctica de la caseína. Presenta un pH cercano a 4,5 debido a la producción de ácido láctico y alto contenido de minerales (más del 80% de los minerales de la leche de partida).

La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso (Poveda, 2013).

Tabla 1. Composición nutricional del lactosuero

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63.00-70.00	63.00-70.00
Lactosa	46.00-52.00	44.00-46.00
Grasa	00.00-5.00	00.00-5.00

Proteína	6.00-10.00	6.00-8.00
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fósforo	0.4-0.7	0.5-0.8
Potasio	1.4-1.6	1.4-1.6
Cloruros	2.00-2.2	2.00-2.2

Fuente: (Panesar et al., 2007)

Tabla 2. Composición nutricional del lactosuero

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	55.00-75.00	55.00-65.00
Lactosa	40.00-50.00	40.00-50.00
Grasa	00.00-5.00	00.00-5.00
Proteína	9.00-14.00	7.00-12.00
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.4
Fósforo	0.4-0.7	0.5-0.8
Potasio	1.4-1.6	1.4-1.6
Cloruros	2.00-2.2	2.00-2.2

Fuente: (Callejas et al., 2012)

2.2.2 USOS DEL LACTOSUERO

Los productos que tradicionalmente se obtienen a partir del suero, son: suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, lactosa obtenida por concentración y concentrados proteínicos. En la actualidad se están haciendo otros aprovechamientos tales como la producción de alcohol, vitamina B12, entre otras de las aplicaciones que se le da al lactosuero para su aprovechamiento es la producción de bebidas lácteas a partir de suero, que se combina con grasa de origen lácteo o vegetal y sustancias aromáticas, así como la utilización del suero en la fabricación de helados (Zambrano & Zambrano, 2013, pág. 8).

Es de interés como sustrato común para la producción de ácido láctico, debido a esto, el lactosuero se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como: la lactosa (3,3 - 6,0%) y proteínas (0,32 - 0,7%), para la utilización completa del suero de leche, es necesario complementar el suero con una fuente de nitrógeno adicional (Wee et al., 2006)

Para Valencia y Ramírez (2009), el lactosuero es utilizado como medio de cultivo para la producción de biomasa como en la fabricación de levadura, metabolitos y enzimas, donde la principal fuente de carbono para los microorganismos es la lactosa. También es empleado en la elaboración de biofertilizantes, que nutren a los cultivos, restauran flora microbiana del ecosistema y eliminan bacterias patógenas. En la industria de empaques, el lactosuero se utiliza para producir un antimicrobiano que es utilizado en la elaboración de películas comestibles, alargando la vida útil del alimento.

2.3 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo, éste debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (García, 2011).

Para la producción económica del ácido láctico se han usado materias primas baratas, entre estos materiales están los celulósicos, los amiláceos, el lactosuero y la melaza.

Los amiláceos son fuente de polisacáridos (principalmente almidón) baratos, abundantes y renovables. Los materiales amiláceos utilizados incluyen el sorgo, la paja de trigo, el maíz, la yuca, el ñame, la papa, el arroz y la cebada. Otra materia prima muy utilizada es la melaza que contiene sacarosa (31% p/v), glucosa (9,5% p/v), fructosa (10%) y nitrógeno (0,95%) y es un sustrato completo para la producción de ácido láctico. Los lignocelulósicos consisten en celulosa, hemicelulosa y lignina. Como materiales lignocelulósicos con gran potencial como materia prima están el sarmiento de vid, jugos de cogollo, hojas y jugo de caña de

azúcar, salvado de trigo, paja de arroz, salvado de arroz y los granos agotados de cervecería (Garcia et al., 2010).

Para la producción de ácido láctico también han sido utilizados desechos orgánicos derivados del procesamiento de alimentos como los residuos del procesamiento de zanahoria, bagazo y lodos de caña, almidón y desechos de alimentos, mazorcas de maíz, desechos de manzana, desechos de piña, mucílago de café, melaza derivada de la producción de xilosa. El licor de maíz es un subproducto de la fabricación de almidón de maíz ha sido usado como fuente de nitrógeno (Wee et al., 2006).

La elección de un microorganismo depende del carbohidrato a ser fermentado: *Lactobacillus delbreuckii* subespecies *delbreuckii* fermentan la sacarosa; *Lactobacillus delbreuckii* subespecies *bulgaricus* usa la lactosa; *Lactobacillus helveticus* es capaz de fermentar lactosa y galactosa; *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovirus* fermentan almidón. *Lactobacillus lactis* puede fermentar glucosa, sacarosa y galactosa (Narayanan et al., 2004). El estudio de la producción de ácido láctico cultivando las células en un medio con diferentes azúcares reveló que *Lactobacillus casei* prefiere lactosa para su crecimiento y producción de ácido láctico, seguido por glucosa y maltosa; mientras la sacarosa fue poco usada (Senthuran et al., 1999)

Diferentes sustratos han sido usados para la producción fermentativa de ácido láctico con *Lactobacillus*. El producto más puro ha sido obtenido cuando es fermentado un medio simple o azúcar puro, resultando en menores costos de purificación; pero esto es desfavorable, dado lo costoso de los medios puros y el ácido láctico es un producto económico, siendo más útil el uso de medios complejos o productos derivados de desechos orgánicos de industrias agroindustriales tabla 3 (García, 2011).

Tabla 3. Producción de ácido láctico a partir de sustratos puros glucosa y lactosa

Sustrato	Suplemento	Fuente
Lactosa (60g/L)		Fu et al., 1999
Lactosa (100g/L)	10g E.L.	Tango y Ghaly, 2002
Glucosa (100g/L)		Min-tian et al., 2005
Glucosa (30g/L)	MRS+ acetato y citrato	Siebold et al., 1995

Sacarosa		Gómez, 2000
MRS+20g/L glucosa	Agua de cocido de maíz 50g L ⁻¹	Lee, 2004
Melazas	Extracto de malta, Sulfato de amonio	Laverde y Muñoz, 1990
Almidón de maíz		Vishnu, et al., 2000
Suero líquido	Lactosa, Sulfato de amonio, Carbonato de sodio, Hexametáfosfato	García et al., 2013
Lactosuero ácido entero y desproteinizado		Cury et al. 2014
Suero líquido		Robalino, 2017
SLC	Riboflavina, extracto de levadura, sulfato de amonio	Plata et al., 2012

E.L. Extracto de Levadura, SLC: Suero de leche caprino

Fuente: (García A. , 2011)

2.3.1 LACTOSUERO COMO MEDIO DE CULTIVO

El lactosuero es un excelente medio de cultivo y se lo utiliza como sustrato para la obtención de un buen número de productos a través de la fermentación. Al ser la lactosa la principal fuente de carbono, parecería que solo puede emplearse microorganismos capaces de emplear este disacárido como fuente de carbono, pero se le puede dar más aplicaciones dado que el azúcar del lactosuero se puede hidrolizar a través de una vía enzimática o a través de una vía ácida y así poder aprovechar el azúcar utilizando microorganismos que utilicen como fuente de carbono la glucosa y la galactosa (García, 2011).

2.4 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es el ácido hidroxicarboxílico más simple con un átomo de carbono asimétrico. Se produce naturalmente en dos isómeros ópticos, D (-) y L (+) - ácidos lácticos. Declarado como seguro por la Administración de Alimentos y Fármacos es GRAS (generalmente reconocido como seguro) de primer grado, compuesto funcional, valioso y versátil (Thakur et al., 2018). Dado que los niveles elevados del isómero D son perjudiciales para los humanos, el ácido láctico L (+) es el

isómero preferido en las industrias alimentaria y farmacéutica (Vijayakumar et al., 2008).

Tanto las dos formas ópticamente activas como la racémica se encuentran en forma líquida, siendo incoloros y solubles en agua. En estado puro son sólidos altamente higroscópicos de punto de fusión bajo. Las formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición. Las propiedades fisicoquímicas del ácido láctico se muestran en la tabla 4 (Serna & Rodríguez, 2005).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃
Peso molecular	90.08
Índice de refracción	1.4414
Punto de fusión	L(+) y D(-): 52.8 a 54 °C
Punto de ebullición	125-140 °C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40.33 mNsm ⁻²
Densidad	1.249
Constante dieléctrica	22 ε

Fuente: (Serna & Rodríguez, 2005)

Existen diferentes tipos de ácido láctico dependiendo del porcentaje de concentración, en la tabla 5 se muestra los tipos de concentraciones y el campo de aplicación.

Tabla 5. Concentraciones de ácido láctico

Campo de aplicación	Concentración
Crudo, técnico o comercial	22, 44 y 50%
Alimenticio	44 y 50%
Transparente o para plásticos	65 y 85%
Grado U.S.P	90%

Fuente: (Solá, 2006)

Actualmente, el ácido láctico (C₃H₆O₃) se produce principalmente (90%) por fermentación utilizando bacterias y hongos seleccionados, ya que este método

puede producir isómeros de ácido láctico individuales. En contraste, siempre se obtiene una mezcla de ambos isómeros cuando se aplican métodos químicos (Pescuma et al., 2015).

Recientemente, ha aumentado el interés en la producción de ácido láctico, ya que se puede utilizar como materia prima para la producción de ácido poliláctico, un polímero utilizado como plástico especial para uso médico y respetuoso con el medio ambiente biodegradable (Panesar et al., 2007, pág. 6).

2.4.1 USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO

Actualmente la demanda mundial del ácido láctico está aumentando, debido a sus múltiples aplicaciones en el campo alimentario y no alimentario. En la figura 1 se muestra como el amplio uso del ácido láctico en las industrias: alimentaria, química, médica, farmacéutica, textil y cosmética.

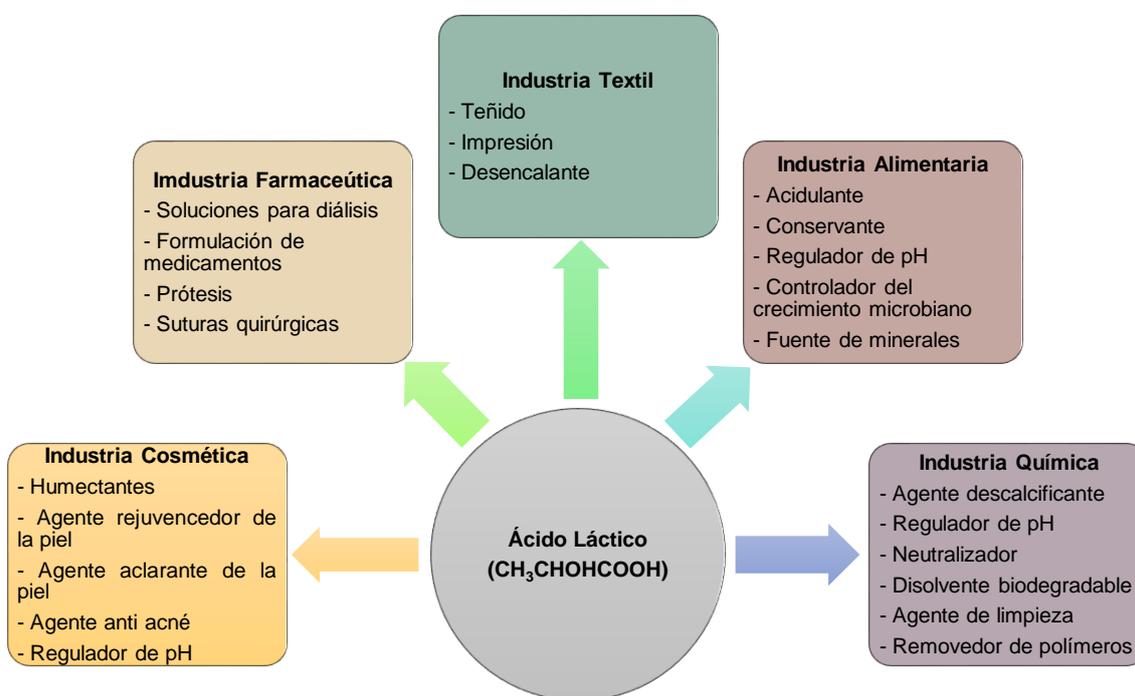


Figura 1. Usos y aplicaciones comerciales del ácido láctico

Fuente: (Wee, Jin, & Ryu, 2006)

Para el caso de los sectores de alimentos y bebidas y cuidado personal utilizan el isómero L ya que el isómero D puede resultar tóxico para el ser humano. En cuanto al sector de los polímeros, esta demanda isómero D o L ya que los plásticos construidos a partir de isómeros puros presentan propiedades superiores a los

elaborados a partir de mezcla racémica. Por último, el sector de solventes y otros usos industriales utiliza la principalmente la mezcla racémica de ácido láctico ya que no es tan importante la quiralidad en este tipo de aplicaciones (Komesu et al., 2017).

También tiene el potencial de convertirse en un producto químico básico como materia prima para productos químicos oxigenados, reguladores del crecimiento de las plantas, disolventes ecológicos e intermedios químicos especiales (Adsul et al., 2007).

2.5 MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Las bacterias y los hongos son los dos grupos de microorganismos que pueden producir ácido láctico. Aunque la mayoría de las investigaciones sobre la producción de ácido láctico se llevaron a cabo con bacterias del ácido láctico (BAL), los hongos filamentosos como *Rhizopus* utilizan glucosa aeróbicamente para producir ácido láctico (Vijayakumar et al., 2008). En la tabla 6 se muestran algunos de los microorganismos utilizados para producir ácido láctico.

Tabla 6. Microorganismos utilizados en investigaciones recientes sobre la producción biotecnológica de ácido láctico

Microorganismo	Ácido láctico g·L ⁻¹	Fuente
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 52311	83.00	(Zhou et al., 1999)
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	144.00	(Wee et al., 2006)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 10863	67.00	(Berry et al., 1999)
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	65.5	(Schepersa et al., 2002)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRRL B-548	38.7	(Burgos et al., 2000)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> Mutant Uc-3	90.00	(Adsul et al., 2007)
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	0.91	(Altiok, 2004)

Fuente: (García, 2011)

Recientemente se ha investigado la aplicación de diferentes microorganismos en los procesos de fermentación, la mezcla de éstos se realiza con el objetivo de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades en menor tiempo (Rojas et al., 2015).

2.5.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias lácticas son gram positivas, ácido tolerantes, algunos en rangos de pH entre 4.8 y 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no soportarían la alta actividad producida por los ácidos orgánicos. Estos organismos no forman esporas, son inmóviles, cocos o bacilos con bajo contenido de guanina y citocina, y asociados todos por sus características metabólicas y fisiológicas comunes (Wee et al., 2006). Las bacterias del ácido láctico pueden dividirse en homofermentativas y heterofermentativas como se muestra en la tabla 7, basadas en los productos producidos a partir de la fermentación de glucosa y lactosa (Vijayakumar et al., 2008).

Tabla 7. Bacterias del ácido láctico homo y heterofermentativo y configuración del ácido láctico

Género y especie	Homofermentativa	Heterofermentativa	Configuración del ácido láctico
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	+	-	D(-)
<i>L. lactis</i>	+	-	D(-)
<i>L. bulgaricus</i>	+	-	D(-)
<i>L. casei</i>	+	-	L(+)
<i>L. plantarum</i>	+	-	DL
<i>L. curvatus</i>	+	-	DL
<i>L. brevis</i>	-	+	DL
<i>L. fermentum</i>	-	+	DL
<i>Sporolactobacillus</i>			
<i>S. inulinus</i>	+	-	D(-)
<i>Streptococcus</i>			
<i>S. faecalis</i>	+	-	L(+)
<i>S. cremoris</i>	+	-	L(+)
<i>S. lactis</i>	+	-	L(+)
<i>Leuconostoc</i>			

<i>L. mesenteroides</i>	-	+	D(-)
<i>L. dextranicum</i>	-	+	D(-)
<i>Pediococcus</i>			
<i>P. damnosus</i>	+	-	DL
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>B. bifidum</i>	-	+	L(+)

Fuente: (Vijayakumar et al., 2008)

En la fermentación con BAL tenemos los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* son los más estudiados en la producción; la mayoría de los *Lactobacillus* producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico; las formas isoméricas de lactato deshidrogenasa presente en *Lactobacillus* determinan el isómero de ácido láctico producido, ya que la deshidrogenasa láctica es esteroespecífica; las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus* producen únicamente isómeros D (García et al., 2010).

Además, las enzimas producidas a partir de BAL son atractivas porque normalmente se consideran seguras, por lo que las enzimas derivadas de ellas pueden usarse sin necesidad de una purificación extensa y hay pocos o ningún efecto adverso en los productos fermentados (Zacharof et al., 2008)

2.5.2 CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA *Lactobacillus casei*

Para Zacharof M. (2008) la capacidad distintiva de *Lactobacillus* es descomponer fuentes de carbohidratos complejos en formas más simples y sintetizar principalmente ácido láctico. Su uso como biorreactores productores de ácido natural ha sido ampliamente investigado en los últimos años, en un esfuerzo por reemplazar la producción de ácido láctico a partir de gasolina y otras fuentes de carbono.

La bacteria *Lactobacillus casei* es productora de ácido láctico predominante de la forma L (+), no metaboliza el citrato y no es capaz de producir diacetilo. Se emplea en la industria láctea en la elaboración de alimentos lácteos probióticos. Se ha comprobado que es muy resistente a intervalos amplios de pH y temperatura, siendo

sus óptimos 6.0 y 37 °C respectivamente. Esta bacteria ácido láctica puede generar diversos productos, dependiendo de la concentración del sustrato en el que se encuentre, es decir, en fermentaciones con altas concentraciones de lactosa y glucosa el producto formado es el ácido láctico mientras que a concentraciones bajas posiblemente se obtenga productos como, acetato, etanol, entre otros (Walstra et al., 2006).

2.5.3 FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* Y LA EFICIENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

2.5.3.1 Fuente de Carbono y Nitrógeno

Todos los microorganismos requieren compuestos orgánicos tanto como fuente de carbono como de energía. Por lo tanto, los carbohidratos se encuentran obviamente entre los nutrientes más importantes para el crecimiento de los microorganismos. A través de reacciones catabólicas y anabólicas, proporcionan energía para el crecimiento y para la síntesis de material celular (Puzanov, 1999).

Diferentes sustratos han sido usados para la producción fermentativa de ácido láctico con LAB. El producto más puro ha sido obtenido cuando un azúcar puro es fermentado, resultando en menores costos de purificación; pero esto es económicamente desfavorable, porque los azúcares puros son costosos y el ácido láctico es un producto económico. En vez de ellos los productos de desechos de la agricultura y la silvicultura son utilizados. Comparando diferentes fuentes de carbono se observa que la glucosa arroja mayores concentraciones de ácido láctico y rendimientos que con otros azúcares. La xilosa, galactosa, arabinosa, lactosa, fructosa y celulosa hidrolizada han sido menos efectivos (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000)

El siguiente nutriente más importante para las bacterias del ácido láctico es el nitrógeno, que es necesario para la biosíntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas. La fuente de nitrógeno orgánico es una mezcla de aminoácidos. Algunas fuentes de nitrógenos que se utilizan en la práctica comercial son los brotes de malta, el extracto de malta, el licor de maceración, la cebada, el extracto de

levadura o la leche sin desnaturalizar. La cantidad de estos se minimiza para simplificar los procesos de recuperación (Puzanov, 1999).

2.5.3.2 pH

La concentración de iones de hidrógeno del ambiente durante la fermentación también afecta el crecimiento microbiano y la tasa de producción del producto. El pH afecta al menos dos aspectos de las células microbianas, es decir, el funcionamiento de sus enzimas y el transporte de nutrientes a la célula. El pH es otro parámetro importante, que tiene un fuerte efecto sobre la producción de ácido láctico, para una fermentación rápida y completa, el rango de pH óptimo es de 5,5 a 6,0, en algunos casos de 6,0 a 6,5, según el cultivo utilizado. La fermentación se inhibe fuertemente a un pH más bajo y cesa a valores de pH por debajo de 4.5. Sin embargo, la tolerancia al ácido LAB les da una ventaja competitiva sobre muchas otras bacterias (Panesar et al., 2007).

2.5.3.3 Temperatura

En los procesos de fermentación industrial, la temperatura del reactor se eleva lo más alto posible para aumentar la tasa de propagación o actividad. Sin embargo, si se excede o se disminuye una temperatura crítica, los microorganismos pueden debilitarse o incluso morir. Existe una temperatura óptima a la que la tasa de crecimiento es máxima y eso depende de las características del microorganismo utilizado, así como de las condiciones ambientales (Pelag, 1995; Panesar et al., 2007).

2.5.3.4 Tasa de dilución

La variación de la tasa de dilución en cultivo continuo afecta tanto al sustrato como a las concentraciones de nutrientes. Sin embargo, los efectos sobre el rendimiento y la productividad no han sido concluyentes (Hofvendahl & Hahn-Hligerdal, 1997).

Cuando las tasas de dilución son altas, el microorganismo no puede crecer lo suficientemente rápido como para compensar la velocidad con la que son arrastradas por la corriente de salida y se produce el “lavado” del cultivo. La concentración del sustrato en el reactor aumenta, hasta alcanzar el valor que tiene

en a la entrada. El valor de la tasa de dilución a la cual ocurre el “lavado” o “wash out” se conoce como tasa de dilución crítica (Martos, 2011).

2.6 SUPLEMENTOS

Amrane (2000), reportó la producción de ácido láctico a partir de lactosuero y explicó la influencia de la deficiencia en péptidos (fuente de nitrógeno), por lo que se emplean diferentes suplementos. Por otra parte, el contenido de proteínas es alto y es un excelente medio para los microorganismos que requieren aminoácidos y son capaces de hidrolizar las proteínas.

Los LAB generalmente tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su capacidad limitada para sintetizar elementos para su propio crecimiento. Si bien las fuentes de carbono se utilizan para generar energía para la proliferación, requieren otros nutrientes como fuentes de nitrógeno, vitaminas y minerales para el mantenimiento, el crecimiento celular y la secreción de ácido láctico. La relación de fuente de carbono a fuente de nitrógeno (C/N) es un factor importante que afecta el proceso de conversión de ácido láctico. Generalmente, una relación (C/N) adecuada, se logra por la adición de fuentes de nitrógeno complejas tales como extracto de levadura, peptona, extracto de carne, entre otras, tiene un efecto positivo en la producción de ácido láctico (Wang et al., 2015).

Las bacterias del ácido láctico tienen requerimientos de nutrientes complejos debido a su capacidad limitada para biosintetizar las vitaminas B y los aminoácidos. Estos comprenden muchas de las vitaminas, aminoácidos e incluso péptidos pequeños conocidos. La suplementación para la producción de ácido láctico tiene efectos positivos (Eldeleklioglu et al., 2013).

- Extracto de levadura

El extracto de levadura es rico en nitrógeno, vitaminas y otros compuestos estimulantes en el crecimiento, razón por la que este es usado como ingrediente en los medios para el cultivo de microorganismos. Por otro lado, todos los estudios realizados sobre el efecto de este en los procesos fermentativos han demostrado un aumento en la producción de ácido láctico (Lund et al., 1992).

- Sulfato de amonio

El sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ está compuesto por el anión sulfato y el catión amonio; éste presenta buena estabilidad química. Estas sales se utilizan en las fermentaciones para suplementar el déficit de nitrógeno y estabilizar el pH del medio de cultivo. El ion amonio es un compuesto químico que forma parte del ciclo del nitrógeno. Este componente en exceso ejerce un efecto perjudicial en el proceso fermentativo, ya que inhibe el crecimiento microbiano (Miyares et al., 2015).

2.7 SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

El término fermentación, en su acepción estricta, se refiere a la obtención de energía en ausencia de oxígeno y generalmente lleva agregado el nombre del producto final de la reacción. Pasteur la denominó "la vie sans l'air" o "la vida sin aire" (Cholota & Mora, 2010).

Para Steinkraus (1996) la fermentación juega al menos cinco roles:

- a) Diversificación de sabores, aromas y texturas.
- b) Preservación de cantidades sustanciales de alimentos a través del ácido láctico, etanol, ácido acético y fermentaciones alcalinas.
- c) Enriquecimiento biológico de sustratos alimenticios con proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- d) Desintoxicación durante el proceso de fermentación alimenticia.
- e) Disminución de los tiempos de cocción y los requerimientos de combustible.

El ácido láctico, por lo general, se produce en modo por lote, pero existen numerosos ejemplos de cultivo continuo, así como lote alimentado y fermentaciones repetidas lotes semicontinuas. Cuando se compara los modos de fermentación por lotes y continuo, el primero resulta en mayores concentraciones de ácido láctico y mejores rendimientos en la mayoría de los estudios. Esto es debido a que todo el sustrato es usado. Por otro lado, el modo continuo resulta en mayores productividades, ya que permite trabajar a altas tasas de dilución y disminuye los tiempos de parada (Suárez, 2007). En la figura 2 se muestran los distintos tipos de operación de biorreactores tanque agitado.

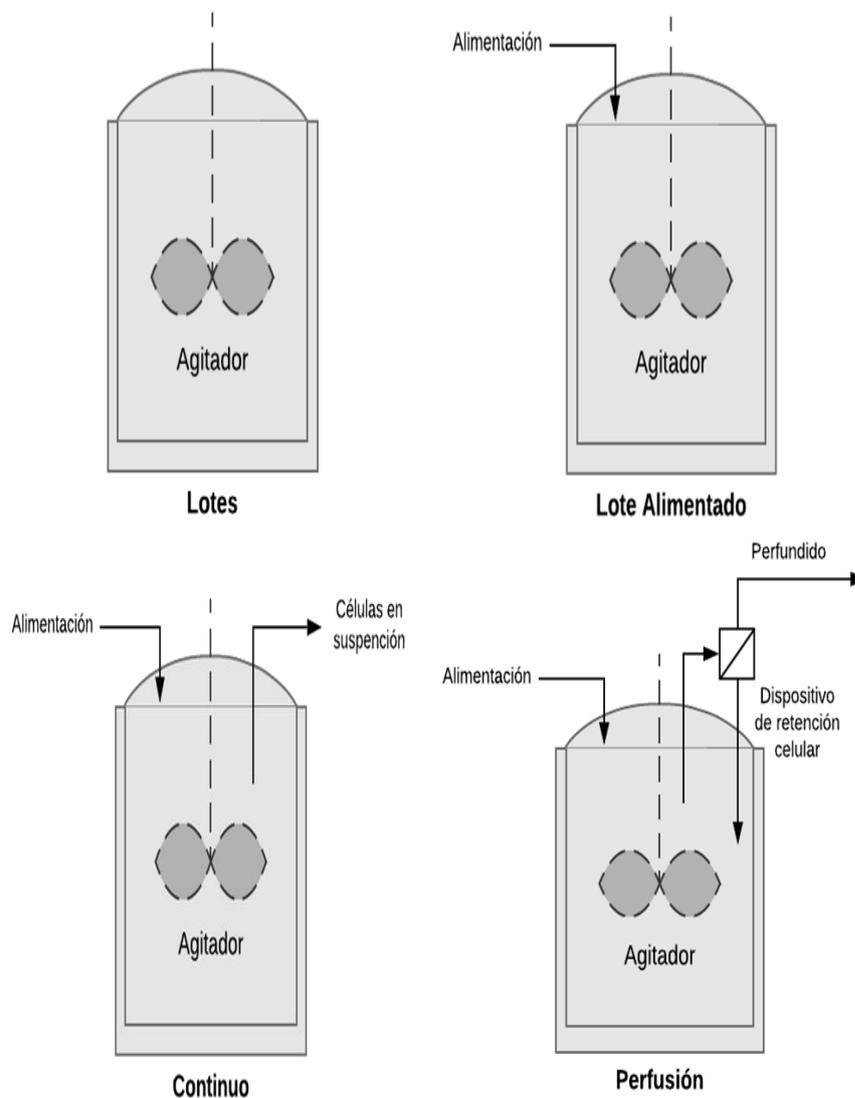


Figura 2. Modo de operación de birreactores

Fuente: (Díaz, 2013)

2.7.1 FERMENTACIÓN CONTINUA

En el proceso de fermentación continua, la fermentación se realiza de forma continua sin vaciar el tanque de fermentación. Implica retirar productos y sustrato agotado al mismo tiempo que se aporta la misma cantidad de sustrato fresco en adición continua. Todas y cada una de las células de los medios de fermentación deben estar en fase logarítmica y no en fase estacionaria. La tasa de adición de medio debe satisfacer los requisitos de nutrientes del organismo de fermentación. Si la tasa de adición de medio es lenta, hay posibilidades de que las células entren en la fase estacionaria (Soto B. , 2019).

Según Martos (2011) para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo por lotes y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y por un rebalse se mantiene el volumen constante. El sobrenadante que sale del biorreactor a un caudal F , tendrá células y la concentración de nutrientes será menor que en el caudal de entrada debido a que en parte fueron consumidos por los microorganismos. Los parámetros de operación característicos en los reactores continuos son:

- **La tasa de dilución: D**

La tasa de dilución D , se define como la relación entre el caudal de alimentación, F y el volumen de cultivo, V ($D = F/V$).

Siendo: D : tasa de dilución (h^{-1}) = número de volúmenes de medio que pasan a través del reactor por hora.

- **El tiempo de retención: t_R**

El tiempo de retención está relacionado con D de la siguiente manera: $t_R = 1/D$, el valor de D corresponde a las veces que se renueva el volumen del biorreactor por unidad de tiempo. En un cultivo continuo se considera que se alcanza el estado estacionario cuando han pasado por lo menos 4-5 tiempos de retención ($t_R = 1/D$).

La fermentación continua tiene la ventaja de lograr altas productividades y no requerir fermentadores grandes (Panesar et al., 2007).

2.7.2 FERMENTACIÓN POR LOTES

Se trata de sistemas cerrados en los que no se varían externamente las condiciones iniciales, lo que supone que la composición del medio va variando continuamente en el tiempo conforme se desarrolla el cultivo. En los procesos discontinuos o tipo lotes, el aporte de nutrientes es único, el tiempo de fermentación es limitado y el producto es recuperado íntegramente al final de la fermentación por vaciado de la cuba del fermentador. Este método es actualmente el más utilizado para los productos que necesitan condiciones de esterilidad muy estrictas (Ertola et al., 2006).

2.7.3 FERMENTACIÓN SEMICONTINUA

El sustrato se aporta de forma secuencial, el sustrato no es añadido completamente al principio. Se debe a que, en ciertos procesos, la concentración de nutrientes ejerce efectos inhibitorios sobre el proceso o el crecimiento del microorganismo; lo que se evita haciendo un aporte secuencial de los nutrientes (Ertola et al., 2006).

2.7.4 FERMENTACIÓN EN PERFUSIÓN

La perfusión corresponde a un modo de operación en el cual un biorreactor tiene una entrada continua de medio de cultivo fresco, así como una salida continua de medio agotado y células. Sin embargo, las células en la salida son separadas y devueltas al cultivo mediante una unidad de retención. Los cultivos en perfusión permiten lograr densidades celulares mayores a los cultivos en modos lote o lote alimentado, gracias a que los nutrientes son suministrados y los productos de desecho son retirados de manera continua, por lo que la principal limitante del cultivo deja de estar en los nutrientes (Abu-Absi et al., 2013).

Según Hu, Kantardjieff y Mulukutla (2007) citados por Véliz, Gerdtzen, Lienqueo y Valdés (2020) otro punto relevante con respecto a los cultivos en perfusión es que, a diferencia de los cultivos continuos, los flujos con los que opera el biorreactor no se encuentran limitados por la tasa de crecimiento máximo de las células.

Las desventajas más importantes de este modo de operación son la necesidad de utilizar equipos complementarios para el proceso. Las corridas en perfusión deben operar por tiempos más prolongados y requieren de una mayor cantidad de medio de cultivo, cuando se compara con el proceso por lotes (Abu-Absi et al., 2013).

2.8 OPTIMIZACIÓN

Según Freire (2013) la optimización de productos y procesos industriales presenta herramientas para la reducción efectiva de costes, mejorando la calidad de los productos y el rendimiento de los procesos.

La optimización de procesos industriales tiene como objetivo mantener los niveles de productividad y eficiencia lo más alto posible, mediante el control y dosificación cuidadosa de las otras variables que pueden medirse durante un proceso.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La investigación se realizó en los laboratorios de las unidades edu-productivas de la carrera de Ingeniería Agroindustrial y sus condiciones ambientales se detallan en la tabla 8.

Los análisis se realizaron en los laboratorios de análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte.

Tabla 8. Localización del experimento

Descripción de la localización del experimento	
Provincia:	Imbabura
Cantón:	Ibarra
Parroquia:	El Sagrario
Altitud:	2256 m.s.n.m
Humedad relativa promedio:	89.2%
Pluviosidad:	623 mm al año
Temperatura media:	16,3 °C

Fuente: (INAMHI, 2020)

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

Para el desarrollo del presente estudio y el cumplimiento de los objetivos propuestos en la investigación, se hará uso de los distintos materiales y equipos que se mencionan a continuación:

3.2.1 MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Lactosuero dulce
- Bacteria ácido láctica (*Lactobacillus casei*-01)
- Caldo MRS “Man, Rogosa y Sharpe”
- Agar MRS “Man, Rogosa y Sharpe”
- Extracto de levadura
- Sulfato de amonio
- Peptona
- Hidróxido de sodio
- Fenolftaleína
- Agua destilada

3.2.2 EQUIPOS

- Biorreactor tipo tanque agitado 4 litros
- Incubadora
- Estufa
- Balanza analítica
- Sensor de pH
- Sensor de temperatura
- Centrifuga
- Autoclave
- Bomba peristáltica
- Agitador Vortex
- Balanza analítica
- Control automático de pH y temperatura
- Refractómetro

3.2.3 MATERIALES

- Probeta
- Recipientes plásticos
- Filtro de tela
- Gradilla
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Cajas Petri
- Pipetas y micro-pipetas
- Matraz Erlenmeyer
- Asas
- Mechero de Bunsen
- Tubos de centrifuga (2 ml, 15 ml)
- Pinzas
- Espátula
- Manguera de silicona ¼”
- Termómetro
- Cintas de pH
- Bureta
- Soporte universal

3.3 METODOLOGÍA

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se llevó a cabo una investigación cuantitativa exploratoria, tuvo como finalidad la experimentación del proceso de fermentación aplicado a los parámetros de control de la producción de ácido láctico, y se cuantificó la cantidad de ácido láctico producida, la productividad volumétrica de ácido láctico y el rendimiento de producto – sustrato a partir de la interacción de dos factores: A: sustrato y B: temperatura de fermentación (°C), con tres niveles cada uno tabla 9. La parte estadística del trabajo investigativo se realizó utilizando Statgraphics Centurion 16.1.

Tabla 9. Factores y niveles estadísticos

Factor A			Factor B		
Sustrato			Temperatura de fermentación		
Niveles			Niveles		
A1	A2	A3	B1	B2	B3
SL	SL + Peptona + Sulfato de Amonio	SL + Extracto de levadura	29 °C	37 °C	45 °C

SL: Suero lácteo

De la interacción de los dos factores en estudio resultaron 9 tratamientos se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Nomenclatura	Descripción
T1	A1B1	2L SL; 29 °C
T2	A1B2	2L SL; 37 °C
T3	A1B3	2L SL; 45 °C
T4	A2B1	2L SL, 5g Peptona, 5g Sulfato de amonio; 29 °C
T5	A2B2	2L SL, 5g Peptona, 5g Sulfato de amonio; 37 °C
T6	A2B3	2L SL, 5g Peptona, 5g Sulfato de amonio; 45 °C
T7	A3B1	2L SL, 10g Extracto de levadura; 29 °C
T8	A3B2	2L SL, 10g Extracto de levadura; 37 °C
T9	A3B3	2L SL, 10g Extracto de levadura; 45 °C

Características de la unidad experimental

Se evaluaron 9 tratamientos con 4 repeticiones al mejor tratamiento resultando 13 unidades experimentales donde cada unidad experimental evaluada fue de dos litros de fermentación con lactosuero obtenido de la producción de queso Holandés de la Empresa Floralp S.A, previo tratamiento de pasteurización a 60 °C durante 15 min y se adicionaron 5 g·L⁻¹ de cada suplemento: extracto de levadura, sulfato de amonio y peptona según corresponda el tratamiento como se muestra en la tabla 10.

VARIABLES A EVALUARSE

En la tabla 11 se detalla las variables evaluadas en el desarrollo del experimento.

Tabla 11. Variables experimentales

Variable	Método	Unidades	Referencia
Cantidad de ácido láctico	Acidez titulable	g·L ⁻¹	(Gerber, 1994)
Cantidad de biomasa	Peso húmedo	g·L ⁻¹	(Arnaiz et al., 2000)
Cantidad de sólidos solubles	Refractómetro	°Brix	(NMX-F-436-SCFI-2011)

Descripción de las variables experimentales

Cantidad de ácido láctico

Según Gerber (1994) el método para determinar la cantidad de ácido láctico mediante acidez titulable se basa en la valoración de la solución agregada de hidróxido de sodio hasta el viraje a la fenolftaleína. La utilización de hidróxido de sodio ajustada a la concentración (0.1 N) permite expresar los grados Dornic en contenido de ácido láctico (dado que el ácido láctico tiene un peso molecular de 90 g) según la siguiente equivalencia:

$$1 \text{ } ^\circ\text{D} = 1 \text{ mg de ácido láctico en } 10 \text{ ml de leche}$$

La acidez expresada como ácido láctico se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \frac{m}{V} = 0.1 \times V \times f$$

En caso de emplear una pipeta volumétrica de 10 ml se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \frac{m}{V} = 0.09 \times V \times f$$

Donde:

V: mililitros de solución de hidróxido de sodio 0.1 N gastados en la titulación.

f: factor de corrección de la normalidad del hidróxido de sodio.

Cantidad de biomasa

Para la determinación de la cantidad de biomasa se utilizó el método directo de peso húmedo. Este método es aplicable a organismos unicelulares (levaduras y bacterias) y hongos filamentosos, se obtiene a partir de una muestra en suspensión que es pesada luego de la separación de las células por filtración o centrifugación (Reynoso et al., 2015). Se basa en la separación por densidades en este caso se pesó un tubo

estéril de 2 ml vacío, se adicionó sustrato fermentado; se centrifugó durante 20 min a 1790 G, se eliminó el sobrenadante y se pesó del sedimento celular.

Cantidad de sólidos solubles

Para la determinación de la cantidad de sólidos solubles se basó en el método del refractómetro según la norma mexicana NMX-F-436-SCFI-2011. Se ajustó el refractómetro con agua destilada. Se depositó 1 gota de la muestra en la superficie del prisma fijo. Se esperó unos segundos hasta que el valor se estabilizó, el valor expresado en °Brix fue la lectura obtenida que indicó el valor de sólidos solubles contenidos en la muestra.

3.3.1 ESTABLECER LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN MEDIANTE LA ECUACIÓN DE CRECIMIENTO PARA DETERMINAR EL TIEMPO Y VELOCIDAD

Para cumplir este objetivo durante la primera etapa de fermentación por lote en la fase de crecimiento logarítmico se determinó la velocidad específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) que se obtiene del balance general de masa ecuación 1.

$$\left(\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{acumulación} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{entrada} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{salida} \end{array} \right) + \left(\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{formación} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Velocidad} \\ \text{consumo} \end{array} \right) \quad (1)$$

A partir de la ecuación 1 del balance general de biomasa se obtuvo la velocidad de crecimiento específica para el cultivo por lote ecuación 2, donde se asume que $\mu = \mu_{\text{máx}}$ en la fase logarítmica.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln \frac{X}{X_0}}{t - t_0} \quad (2)$$

Donde:

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad de crecimiento específica máxima

X: concentración final de biomasa en la fase logarítmica

X₀: concentración inicial de biomasa en la fase logarítmica

t: tiempo final de la fase logarítmica

t₀: tiempo inicial de la fase logarítmica

Determinada la $\mu_{\text{máx}}$ se determinó el tiempo de duplicación del microorganismo (t_d) que se define como el tiempo necesario para que la biomasa se duplique a partir de la ecuación 3.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3)$$

Donde:

t_d: tiempo de duplicación

μ: velocidad de crecimiento específica

Para la fase de cultivo continuo utilizando la ecuación 1 del balance general de masa aplicado a los cultivos continuos se obtiene la ecuación 4 y el factor de dilución (D_c) se determina con la ecuación 5, en esta etapa con el volumen constante de (2 L) se determina el flujo de alimentación al biorreactor. Se consideró estado estacionario una vez que se pasaron 10 volúmenes de fermentación, comprobando este estado con tres valores consecutivos iguales de concentración de biomasa y concentración de ácido láctico.

$$\frac{dx}{dt} = \mu * X_v - D_c * X_v \quad (4)$$

$$\mu = D_c = \frac{F}{V} \quad (5)$$

Donde:

μ: Velocidad de crecimiento específica

D_c: Factor de dilución

F: Flujo de alimentación

V: Volumen de fermentación

3.3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN, PRODUCTIVIDAD Y RENDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En el cultivo continuo se determinaron los parámetros de productividad y rendimiento de ácido láctico.

Productividad Volumétrica

La productividad volumétrica en el cultivo continuo en estado estacionario está definida como los gramos de ácido láctico producidos por unidad de volumen, en un tiempo dado, se obtiene del producto del factor de dilución por la concentración del producto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ecuación 6.

$$Q = D_c \times P \quad (6)$$

Donde:

D_c: Factor de dilución

P: Concentración del producto en estado estacionario

Rendimiento de Producto - Sustrato

El rendimiento observado de producto en sustrato está definido como los gramos de producto obtenido sobre los gramos de sustrato consumido ecuación 7.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{producto obtenido (g)}}{\text{sustrato consumido (g)}} \quad (7)$$

3.3.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD

Debido a los largos períodos de tiempo empleados en los cultivos continuos se realiza 4 repeticiones al mejor tratamiento basado en la productividad volumétrica de ácido láctico, con los cuales se realiza la optimización. Para optimizar las variables del proceso y maximizar la productividad volumétrica y rendimiento de ácido láctico se utiliza un método numérico para la resolución de la ecuación polinómica obtenida de la gráfica de dispersión a través de la primera derivada de

dicha función mediante el uso del programa estadístico Statgraphics Centurion 16.1, encontrando el factor de dilución óptimo en relación con la productividad volumétrica de ácido láctico y rendimiento producto – sustrato.

3.4 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

En la figura 3 se representa el diagrama de bloques para la obtención de ácido láctico a escala de laboratorio.

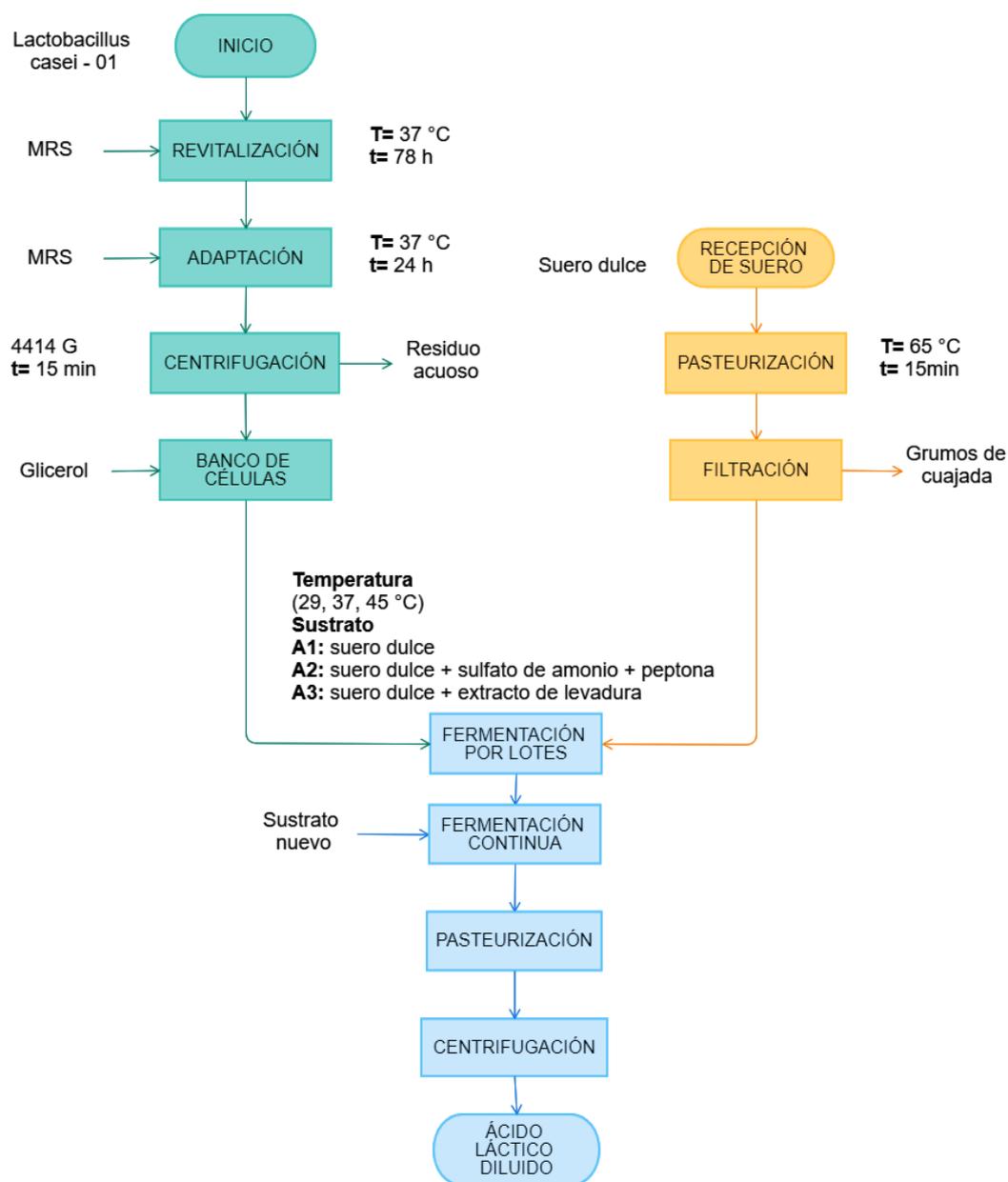


Figura 3. Diagrama de proceso

DESCRIPCIÓN DEL DIAGRAMA DE PROCESO

Recepción de materia prima

El lactosuero para llevar a cabo el desarrollo de la investigación fue un suero dulce, subproducto de la elaboración de queso Holandés, se receipto en recipientes plásticos en condiciones higiénicas para garantizar el resultado final.

Pasteurización

Se pasteurizó a una temperatura de 65 °C durante 15 min; tratamiento en el cual se produce la destrucción total de microorganismos patógenos, pero no afecta a la desnaturalización de proteínas presentes (Valverde, 2012).

Filtración

Luego de la pasteurización con ayuda de un tamiz previamente esterilizado se retira partículas presentes en el lactosuero.

Revitalización de cepa liofilizada de *Lactobacillus casei* - 01

Dentro de una cabina de flujo laminar para evitar posible contaminación. En una balanza se pesará 0.01g de cepa liofilizada de *Lactobacillus casei* - 01, en un tubo de ensayo se colocará 10 ml de caldo MRS previamente preparado juntamente con la cepa liofilizada y se incubará a 37 °C durante 24 horas, transcurrido este periodo se tomará 1ml de este y se agregará a 9 ml de caldo MRS se incubará a 37 °C durante 6 horas. Posteriormente se realizará siembra por estrías en profundidad en agar MRS se incubará a 37 °C durante 48 horas.

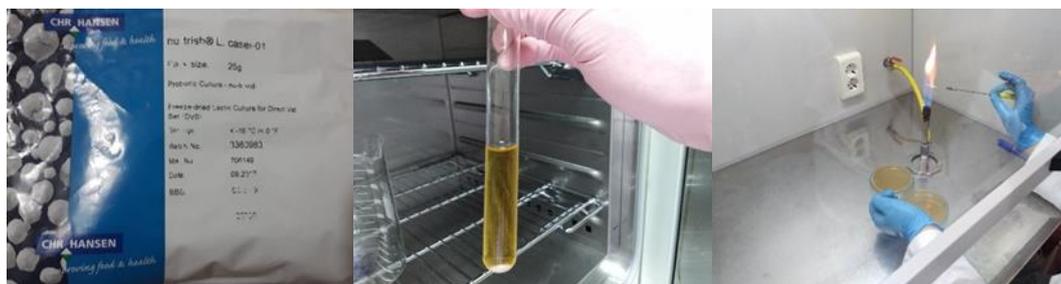


Figura 4. Revitalización de la cepa *L. casei* - 01 **a)** Cepa liofilizada *L. casei* - 01, **b)** Activación del microorganismo medio MRS, **c)** Siembra en placa medio sólido MRS

Adaptación del microorganismo

Después de realizar la revitalización de la cepa *Lactobacillus casei* - 01 se adaptará el microorganismo tomando una colonia formada en la caja Petri inoculando en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de caldo MRS se incubaba a 37 °C durante 24 horas.



Figura 5. Adaptación del microorganismo medio MRS

Formación de banco de células

Mediante centrifugación se separaron las células del sobrenadante en condiciones de 4414 G durante 20 minutos. Posteriormente con ayuda de una punta estéril y la micro-pipeta se toma 1000 μ l de biomasa en un tubo de 2 ml previamente esterilizado, con otra punta estéril se coloca 1000 μ l de glicerol, con ayuda del agitador Vortex se mezcló el contenido de cada tubo y se almacenó a temperatura de -20 °C.



Figura 6. Banco de células *L. casei* - 01

Fermentación ácido láctica continua

La fermentación continua se realizó en un biorreactor controlando temperatura, agitación y pH figura 6, conectado mediante mangueras a las bombas peristálticas que controlan la velocidad de entrada del lactosuero. Inicialmente se operó como un cultivo por lotes, posteriormente se determinaba por peso húmedo la velocidad específica de crecimiento y el flujo de alimentación de la bomba alcanzando su fase exponencial se bombeo medio fresco al interior del fermentador y se extrae el producto obtenido; alcanzando el estado estacionario donde la concentración es constante el proceso se detiene.



Figura 7. Proceso de fermentación

Se evaluaron las condiciones de temperatura de (29, 37 y 45 °C), se suplementó el medio compuesto de lactosuero dulce con los suplementos (extracto de levadura y sulfato de amonio más peptona), las variables respuestas fueron concentración $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, productividad volumétrica $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ y rendimiento producto – sustrato $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Cada tratamiento se inició por fermentación por lotes, alcanzada la fase de aceleración positiva se determina la velocidad de crecimiento máxima, se calcula el factor de dilución según las ecuaciones 2 y 5 y empieza el cultivo continuo. Se asume que el cultivo se encuentra en el estado estacionario cuando han transcurrido al menos tres tiempos de residencia en cada tratamiento que corresponde a que pasaron 10 volúmenes de cultivo según establece (Sánchez, 2005).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTABLECER LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN MEDIANTE LA ECUACIÓN DE CRECIMIENTO PARA DETERMINAR EL TIEMPO Y LA VELOCIDAD ESPECÍFICA

La determinación de los parámetros cinéticos de fermentación se realizó a partir del balance de biomasa descrito en la metodología, obteniéndose los resultados de velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d), tiempo de fermentación en lotes (t) y rendimiento producto – sustrato en el cultivo por lotes ($Y_{p/s}$). En la tabla 12 se muestra los resultados de las variables cinéticas en cultivo por lote.

Tabla 12. Parámetros cinéticos calculados en cultivos por lotes para *L. casei* - 01

Tratamiento	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	t (h)	t_d (h)	$Y_{p/s}$ (%)	$Y_{x/s}$ (%)
T1	0.43	2.00	1.61	12.14	17.57
T2	0.32	2.00	2.16	11.99	20.68
T3	0.63	2.00	1.10	11.99	46.80
T4	0.47	2.00	1.47	17.07	44.17
T5	0.31	2.00	2.24	18.28	8.54
T6	0.19	1.30	3.65	22.58	9.08
T7	0.21	1.30	3.30	17.26	14.85

T8	0.18	1.30	3.85	20.32	3.20
T9	0.31	1.30	2.24	15.80	4.61

En el T3 se obtuvieron los mejores resultados de variables analizadas, esto puede ser debido a la simplicidad del sustrato (suero de leche sin suplemento) ya que el microorganismo una vez inoculado en el biorreactor se enfrenta a una serie de cambios físicos y químicos como la concentración de sustrato otro aspecto importante es la combinación con la temperatura (45 °C) reportada como optima según (Flores et al., 2021). Se obtuvo una velocidad de crecimiento específica de 0.63 h⁻¹ con tiempo de duplicación 1.1 horas comparado con el obtenido por Arrazola et al. (2013) menciona que la concentración de los microorganismos aumenta con la velocidad de crecimiento, la cual depende principalmente de la composición y concentración del sustrato, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Según Iñiguez y Castillo (2011) diferentes compuestos orgánicos como el extracto de levadura y peptona utilizados como suplemento son susceptibles de degradación a ciertas temperaturas por un tiempo prolongado.

4.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN, PRODUCTIVIDAD Y RENDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Una vez determinadas los mejores resultados cinéticos en el cultivo por lotes se realizaron las corridas en cultivo continuo, ajustando el factor de dilución a la velocidad de crecimiento ($D=\mu_{max}$) y se determinó para cada tratamiento la concentración de ácido láctico (P), productividad volumétrica (Q) y rendimiento producto – sustrato ($Y_{p/s}$) una vez alcanzado el estado estacionario. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros cinéticos calculados en el estado estacionario para *L. casei* - 01

Tratamiento	Nomenclatura	P (g·L ⁻¹)	Q (g·L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (%)
T1	A1B1	3.5	1.52	45.92
T2	A1B2	3.7	1.20	52.83
T3	A1B3	3.4	2.15	47.16

T4	A2B1	4.5	2.13	51.40
T5	A2B2	7.1	2.20	86.17
T6	A2B3	5.6	1.04	69.70
T7	A3B1	4.5	0.96	50.80
T8	A3B2	6.0	1.08	76.65
T9	A3B3	3.9	1.32	46.18

En este objetivo se busca maximizar la producción de ácido láctico, se puede evidenciar que para las variables analizadas el mejor tratamiento fue T5 (suero dulce suplementado con sulfato de amonio y peptona y temperatura de 37 °C). El valor de temperatura se encuentra dentro del rango de temperaturas de crecimiento de la bacteria, el uso de suplementos en la combinación de peptona y sulfato de amonio aportan una importante concentración de fuente de nitrógeno al medio que es importante en el desarrollo de bacterias y metabolitos primarios. El factor de dilución utilizado corresponde a $D = 0.31 \text{ h}^{-1}$, valor que no es de los más altos, pero a este valor el microorganismo utilizado demostró mejor aprovechamiento de los sustratos y conversión de ácido láctico, este valor es cercano al obtenido por Suárez (2007) quien alcanzó $D = 0.35 \text{ h}^{-1}$ con *Lactobacillus casei* ATCC 7469 cultivado en un medio compuesto por MRS y glucosa. El resultado de $D = 0.31 \text{ h}^{-1}$ es mejor en comparación con el obtenido por Urribarri et al., (2004) y Trujillo et al., (1998) quienes lograron $D = 0.20 \text{ h}^{-1}$ con *Lactobacillus bulgaricus* cultivado en un medio compuesto por suero dulce de leche desproteínizado y *Lactobacillus helveticus* cultivado en un medio compuesto por suero de leche respectivamente. Según Garcia et al. (2010) la temperatura de crecimiento del *Lactobacillus casei* está en un rango de 20 - 40 °C y varía entre géneros, para Panesar et al. (2007) los rangos varían entre 30 - 45 °C. Respecto a resultados obtenidos en la investigación de Urribarri et al. (2004) la productividad volumétrica fue de $1.83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ utilizando como sustrato solamente lactosuero. El rendimiento de producto – sustrato $Y_{p/s}$ obtenido de $0.86 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ siendo superior al reportado por García et al. (2013) de $0.53 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ utilizando como suplementos lactosa y sulfato de amonio.

4.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD

Analizados los datos anteriores en el estado estacionario se procedió a realizar cuatro corridas del tratamiento (T5) a diferentes velocidades de dilución en la búsqueda de mayor productividad y rendimiento. Los resultados se encuentran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores de productividad volumétrica, rendimiento producto – sustrato a distintos factores de dilución

Tratamiento	Descripción	D (h ⁻¹)	Q (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Y _{p/s} (%)
T5		0.26	1.39	62.41
	SL, 5 g Peptona, 5 g	0.43	2.86	78.14
	Sulfato de amonio, 37 °C	0.60	3.17	58.47
		0.33	1.88	65.88

Se evidencia que existe un valor máximo de factor de dilución, el cual se debe verificar para evitar estar cerca del efecto que ocurre en los cultivos continuos que es llamado lavado como bien describe (Martos, 2011). Aunque existen estudios de cultivos continuos con factor de dilución de hasta $D = 3.0 \text{ h}^{-1}$ (Trujillo et al., 1998).

En la búsqueda de un factor de dilución óptimo para la productividad, se ajustaron los valores de factor de dilución vs productividad volumétrica a una ecuación polinómica. Para la maximización de la productividad volumétrica, los resultados se encuentran en la figura 8.

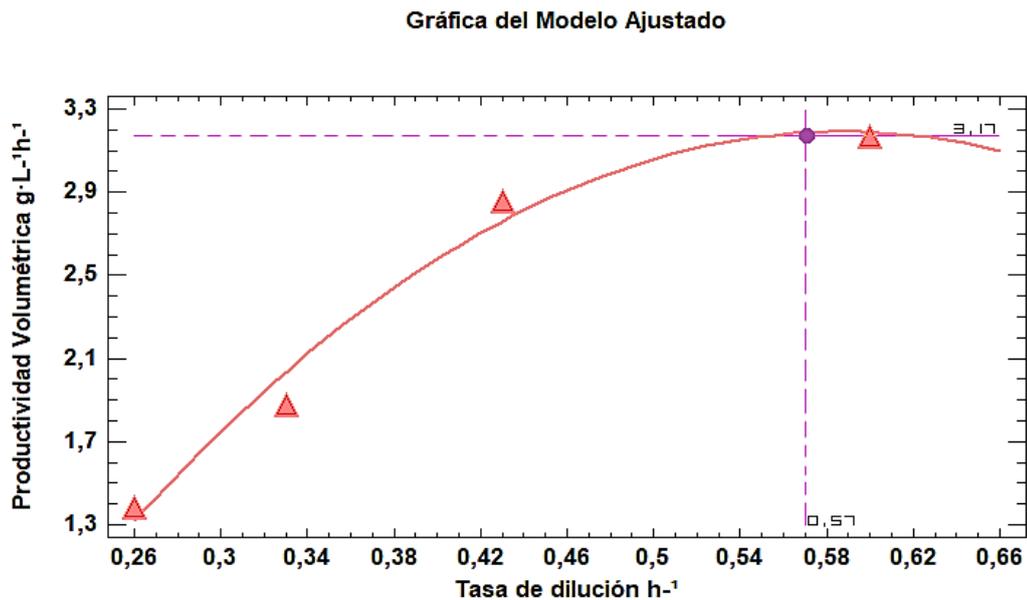


Figura 8. Factor óptimo de dilución para la productividad volumétrica de ácido láctico

Se evidencia que el óptimo de factor de dilución encontrado no es el valor máximo obtenido, con un ajuste de $R^2 = 94.30\%$, la ecuación polinómica 8 es la resultante de la optimización para la productividad (Q):

$$Q = -2.84323 + 20.5563 * D - 17.5053 * D^2 \quad (8)$$

La resolución matemática proporcionó que el factor de dilución óptimo teórico que maximiza Q es $D_{op} = 0.57 h^{-1}$, para una máxima productividad volumétrica de $3.17 g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. Este valor de D_{op} es mayor a los reportados por Estela et al. (2007) de $0.46 h^{-1}$, el cual refiere que el factor de dilución tiene una relación directamente proporcional con la productividad donde a mayor D se podrá obtener mayores valores de productividad, sin llegar al efecto de lavado dentro del biorreactor.

Se correlacionaron los valores experimentales observados y predichos por el modelo, los puntos se encuentran cercanos a la línea diagonal representados en la figura 9.

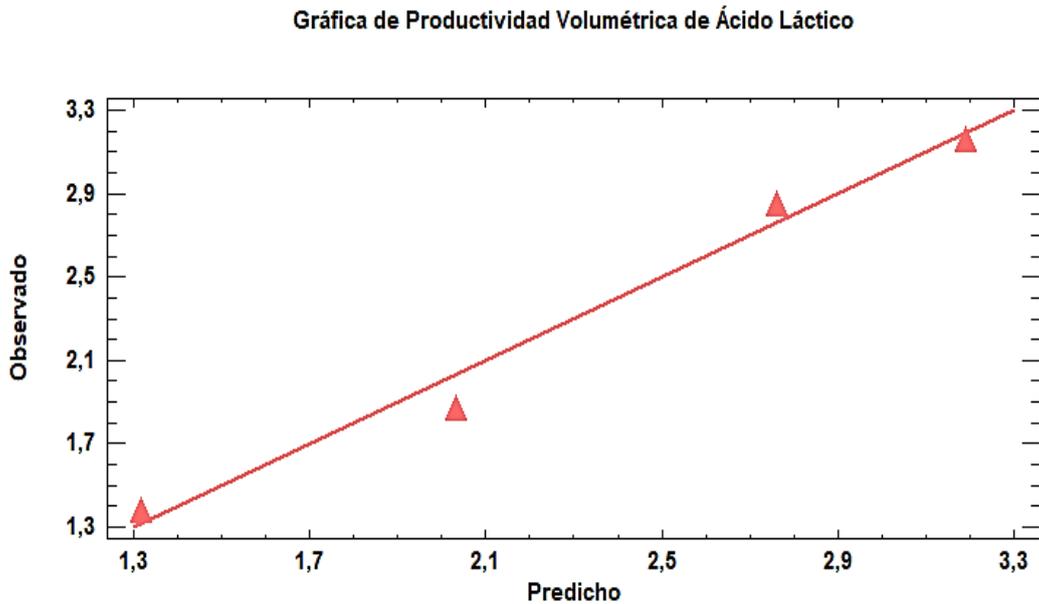


Figura 9. Valores predichos vs observados de productividad volumétrica de ácido láctico. Se obtuvo una correlación entre las variables predicho y observada positiva de la productividad con valor de R^2 de 98,09% el cual, valida la significancia estadística del modelo, evidenciando una buena correlación.

En la figura 10, se muestran los valores predichos vs residuos, en la que no se observa un patrón en los residuos que afecte el modelo.

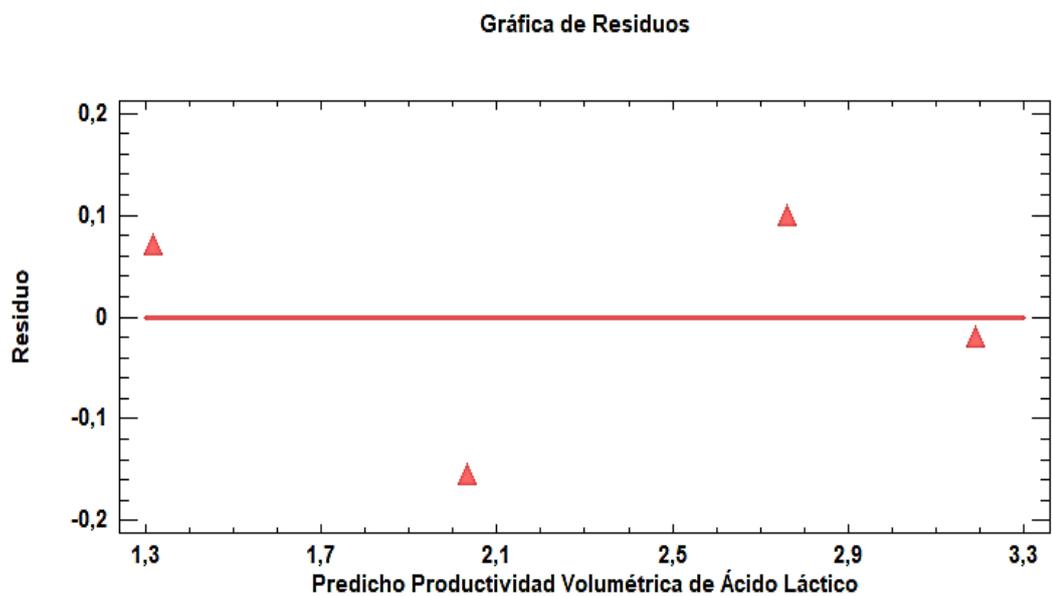


Figura 10. Valores predichos vs residuos

Se obtuvo un error estándar de estimación de 0.1984, este valor confirma la poca dispersión de los residuos e indica buena precisión y confiabilidad de las corridas experimentales para esta variable.

También se graficaron los valores de rendimiento producto - sustrato ($Y_{p/s}$) y se ajustaron a una ecuación polinómica para evaluar su comportamiento y buscar un máximo teórico, en la figura 11.

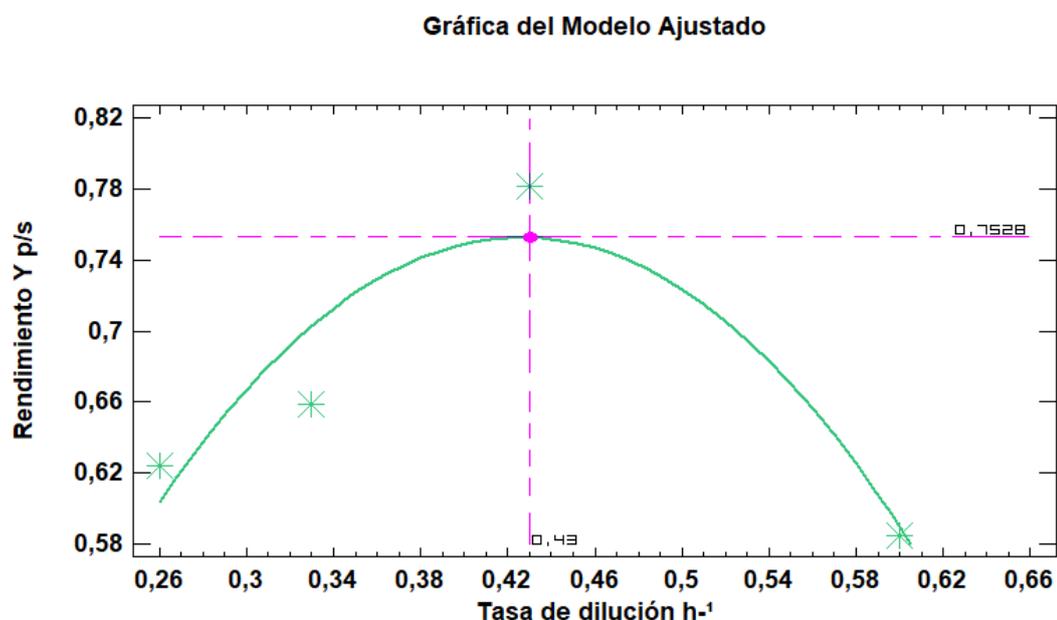


Figura 11. Factor óptimo de dilución para el rendimiento $Y_{p/s}$ de ácido láctico

Se pudo obtener un máximo teórico de factor de dilución (D) para el rendimiento a partir de la resolución de la ecuación polinómica 9:

$$Y_{p/s} = -0.250755 + 4.71219 * D - 5.53191 * D^2 \quad (9)$$

El factor de dilución óptimo, encontrando 0.43 h^{-1} como factor de dilución óptimo para un máximo rendimiento $Y_{p/s}$ de 75.28%. Valores mayores o menores al obtenido de D tiende a ser menor el $Y_{p/s}$.

Este valor de factor de dilución óptimo D_{op} es mayor a los reportados por Estela et al. (2007) de 0.24 h^{-1} , el cual refiere que fuera de este valor del factor de dilución óptimo tiene una relación inversamente proporcional con el rendimiento $Y_{p/s}$ donde a mayor o menor D se obtienen valores menores de rendimiento.

Se graficaron los valores predichos vs observados para el rendimiento que se encuentran gráfica de figura 12.

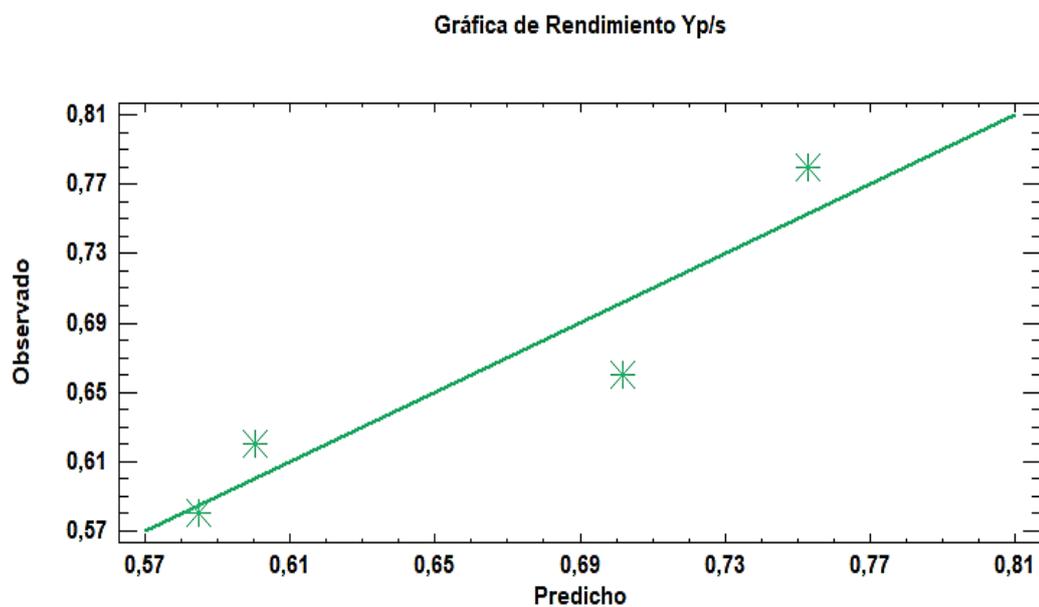


Figura 12. Valores predichos vs observados de rendimiento producto – sustrato de ácido láctico

Se obtuvo un valor de R^2 de 81,02%, de los puntos sobre la línea diagonal que indica que el modelo es adecuado para describir el rendimiento de producto - sustrato de ácido láctico bajo los valores evaluados de sustrato y temperatura.

En la figura 13, se muestran los valores predichos vs residuos.

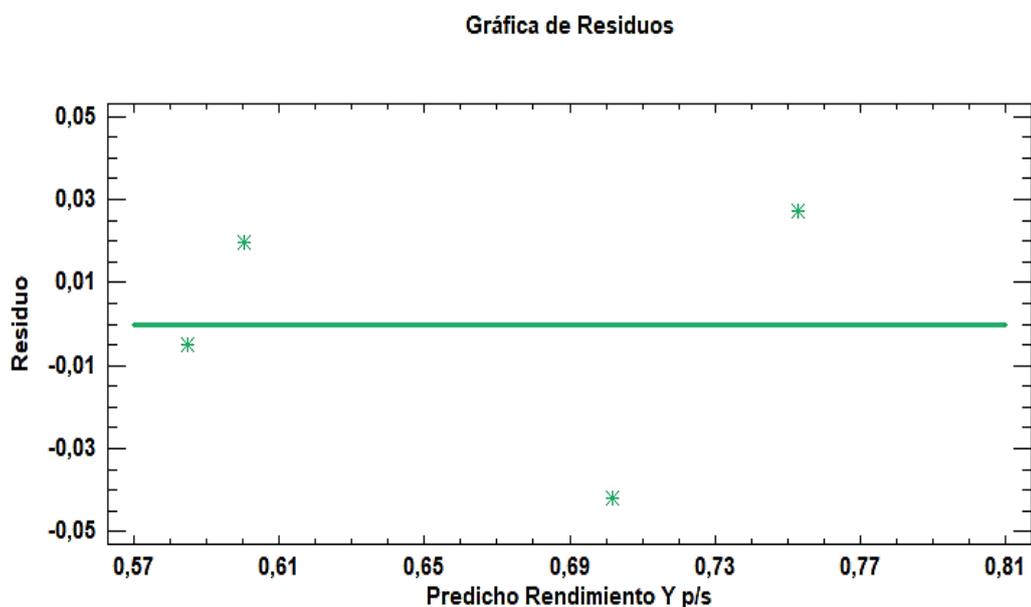


Figura 13. Valores predichos vs residuos

Los datos confirman la alta significancia estadística del modelo mostraron con valores inferiores al 5.0% y el error estándar de estimación de 0.053%.

Se realizó una comparación con diferentes estudios en cultivo continuo, en la tabla 15 se presentan valores de productividad volumétrica de ácido láctico a diferentes condiciones de cultivo y diferentes especies.

Tabla 15. Productividad volumétrica de ácido láctico a diferentes condiciones de cultivo

Sustrato	Microorganismo	Suplementos	Condiciones de fermentación	Productividad volumétrica (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Referencia
Lactosuero	<i>Lactobacillus casei</i> - 01	Sulfato de amonio, peptona	37 °C	3.17	Este estudio
Lactosuero	<i>Lactobacillus casei</i> - 01	--	45 °C, pH 6.8, 2.4 h ⁻¹ inmovilización	6.90	(Novoa et al., 2019)
Glucosa	<i>Lactobacillus plantarum</i> L10	E. L.	37 °C, pH 5.8	6.00	(Estela et al., 2007)
Lactosuero *	<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 8018	E. L, peptona trípica de caseína	40 °C, pH 5.9	1.83	(Urribarri et al., 2004)

*desproteínizado; E. L. (extracto de levadura)

La productividad volumétrica de ácido láctico obtenido en este estudio fue de 3.7 g·L⁻¹·h⁻¹ siendo menor a los resultados reportados por Novoa et al. (2019) y Estela et al. (2007) que obtuvieron 6.9 g·L⁻¹·h⁻¹ y 6.0 g·L⁻¹·h⁻¹ respectivamente. Dichos resultados podrían deberse a la utilización de células inmovilizadas generando mayor densidad celular y como consecuencia mayores velocidades de reacción y mayor productividad volumétrica, y al uso de diferente sustrato, especie de *Lactobacillus* y diferentes condiciones de fermentación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La cinética de fermentación demostró que la temperatura y el tipo de suplemento influye en la velocidad específica de crecimiento del *L. casei*.
- El lactosuero suplementado con sulfato de amonio y peptona genera mayor productividad volumétrica y rendimiento producto –sustrato de ácido láctico en un proceso de fermentación continuo.
- Se logró obtener por métodos numéricos un valor máximo de factor de dilución en la fermentación continua, que garantiza la mayor productividad volumétrica y el rendimiento producto – sustrato de ácido láctico.
- Se acepta la hipótesis alternativa ya que se demostró que al suplementar el lactosuero con fuente de nitrógeno aumenta la concentración de ácido láctico y la productividad volumétrica durante el proceso de fermentación.

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de escalado con los resultados obtenidos.
- Realizar estudios con los factores de dilución óptimos obtenidos.
- Desarrollar una metodología para la extracción y purificación del ácido láctico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Abu-Absi, S., Xu, S., Graham, H., Dalal, N., Boyer, M., & Dave, K. (Octubre de 2013). Cell culture process operations for recombinant protein production. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 35-68. doi:10.1007/10_2013_252.
- ACOFARMA, S.C.L. (22 de Enero de 2014). *Fichas técnicas: ACOFARMA, S.C.L.* Obtenido de Ácido láctico: http://www.acofarma.com/jdownloads/Fichas_Tecnicas/a061.htm
- Adsul, M., Khire, J., Bastawde, K., & Gokhale, D. (2007). Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Applied and environmental microbiology*, 73(15), 5055-5057. doi:10.1128/AEM.00774-07
- Altioik, D. (2004). Kinetic modelling of lactic acid production from whey. *Food Engineering*.
- Amrane, A. (2000). Evaluation of lactic acid bacteria autohydrolyzate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 1(10), 207-209. doi:<https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1020342>
- Arnaiz, C., Isac, L., & Martinez, L. (Octubre de 2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos I. *Tecnología del agua*, 20(205), 45-52. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/323878369_Determinacion_de_la_biomasa_en_procesos_biologicos_I_Metodos_directos_e_indirectos
- Arrazola, G., García, C., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotecnología en el*

- Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 136-143. Obtenido de <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/267>
- Aspasia, A., Chatzipaschali, & Stamatis, A. (2012). Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: current status and prospects. *Energies*, 5(12), 3492-3525. doi:10.3390/en5093492
- Banco Central del Ecuador. (2017). *Sistema de Información Nacional SINAGAP*. Obtenido de Banco Central del Ecuador: <http://sinagap.magap.gob.ec/Sina/paginasCGSIN/VisorReporte.aspx>
- Berry, A., Franco, C., Zhang, W., & Middelberg, A. (1999). Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnological letter*, 163-167.
- Burgos, C., Okos, M., & Wankat, P. (2000). Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology progress*, 305-314.
- Callejas, J., Prieto, F., Reyes, V., Marmolejo, Y., & Méndez, M. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta universitaria*, 22(1), 11-18. doi:<https://doi.org/10.15174/au.2012.304>
- Carrillo, W. (2016). Implementación de una micro empresa comunitaria de industrialización y comercialización de lácteos en la comunidad de Tuntatacto, cantón Guano, provincia de Chimborazo, y su impacto en el desarrollo socioeconómico, año 2015. *Boletín de coyuntura*(11), 7-9. Obtenido de <https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/bcoyu/article/view/618/446>
- Cholota, L., & Mora, O. (2010). *Diseño, construcción y pruebas de un sistema prototipo para la producción de etanol a partir de papa, zanahoria, remolacha y lacto suero*. Tesis de grado , Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/289>

- Christensen, C., Rass-Hansen, J., Marsden, C., Taarning, E., & Egeblad, K. (2008). The Renewable Chemicals Industry. *ChemSusChem*, 1(4), 283-289. doi:doi:10.1002/cssc.200700168
- Díaz, D. M. (2013). Continuous agave juice fermentation for producing bioethanol. *Biomass now sustainable growth and use*, 209-230. doi:http://dx.doi.org/10.5772/55923
- Eldeleklioglu, B., Bayraktar, E., & Mehmetoglu, Ü. (2013). The effects of nutrient supplements on the production of lactic acid from cheese whey. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(1), 81-91. doi:10.5505/tjb.2013.46036
- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (2006). *Microbiología industrial*. Washington USA: Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Obtenido de http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/Microbiologia_Industrial_Libro.pdf.
- Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivo batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 12(4), 271-275. doi:https://doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1797.
- Flores, J., Núñez, J., Pais, J., Sánchez, I., & Lara, M. (2021). *Optimización estadística de un bioproceso de ácido láctico a partir de lactosuero*. Tesis de grado, Ibarra. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11169/2/03%20EIA%20513%20TRABAJO%20GRADO.pdf>
- Freire, S. (2013). *Optimización del proceso de producción de yogurt en la empresa PROALIM*. Tesis de grado, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2506/1/96T00186.pdf>
- Ganju, S., & Gogate, P. (2017). A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, 215, 84-96. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021

- García, A. (2011). *Producción de ácido L (+) láctico a partir de lactosuero utilizando Lactobacillus casei en cultivo batch*. Cordoba.
- García, C., Arrázola, G., & Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas agrarios*, 15(2), 9-26. doi:<https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>
- García, C., Arrázola, G., & Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas agrarios*, 9-26.
- García, C., Arrázola, G., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando Lactobacillus casei. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 136-143.
- Gerber, N. (1994). *Tratado práctico de los análisis de la leche y del control de los productos lácteos*. España. Recuperado el 3 de Enero de 2020
- Gil, R., Domínguez, R., & Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: procesos de separación y purificación. *Tecnología, ciencia, educación*, 70-90.
- González, M. (2012). Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la industria láctea. *Mundo pecuario*, 8(1), 16-32. Obtenido de <https://www.virtualpro.co/biblioteca/aspectos-medioambientales-asociados-a-los-procesos-de-la-industria-lactea>
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and microbial technology*, 26(2), 87-107. doi:10.1016/S0141-0229(99)00155-6.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (1997). L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(4), 301-307. doi:[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)83489-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)83489-8)
- Hu, W.-S., Kantardjieff, A., & Mulukutla, B. (2007). An advanced course in cellular bioprocess technology. *Fundamentals and frontiers*.

- INAMHI. (2020). *Boletín Climatológico Mensual*. Obtenido de INAMHI: https://www.serviciometeorologico.gob.ec/meteorologia/boletines/bol_mensual.pdf
- INEC. (Mayo de 2021). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC 2020: INEC*. Recuperado el 21 de Mayo de 2018, de Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC 2020: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Boletin%20Tecnico%20ESPAC%202020.pdf
- Iñiguez, A., & Castillo, A. (2011). *Obtención de ácido láctico a partir del almidón de papa Solanum Tuberosum L., como materia prima para la fabricación de material descartable biodegradable*. Tesis de grado, Cuenca. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1514/12/UPS-CT002110.pdf>
- Jakymec, M., Morán, H., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Ramones, E. (2001). Cinética de producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista científica FCV-LUZ*, 11(1), 53-59. Obtenido de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14751/14728>
- Komesu, A., Oliveira, J., Martins, L., Wolf, M., & Maciel, R. (2017). Lactic acid production to purification: a review. *Bioresources*, 12(2), 4364-4383. doi:10.15376/biores.12.2.Komesu
- Lund, B., Norddahl, B., & Ahring, B. (1992). Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 14(9), 851-856. doi:<https://doi.org/10.1007/BF01029152>
- Martos, M. A. (2011). *Modo de operación de biorreactores*. Argentina: Editorial Universitaria de la Universidad Nacional de Misiones. Recuperado el 16 de Noviembre de 2020, de <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0N1YWRIcm>

5vc19kZV9D4XRlZHJhX0VkaXRvcmlhbF9Vbml2ZXJzaXRhcmlhL0N1
YWRlcm5vc19kZV9D4XRlZHJhX0lWLnBkZg%3D%3D&cidReset=true
&cidReq=BIOALIM

MCPEC; MIPRO. (16 de Diciembre de 2016). *Poítica industrial del Ecuador 2016-2025: MCPEC; MIPRO*. Recuperado el 22 de Mayo de 2018, de Cadenas agroindustriales: <https://www.industrias.gob.ec/wp-content/uploads/2017/01/politicaIndustrialweb-16-dic-16-baja.pdf>

Miyares, M., Torres, D., Padrón, S., Valdés, J., Díaz, M., & Bonilla, M. (2015). Aplicación del reactivo de Neesler en la cuantificación de amonio para las fermentaciones de productos biotecnológicos. *Vaccimonitor*, 24(1), 33-44. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2015000100005

Muñi, A., Paez, G., Faría, J., Ferrer, J., & Ramones, E. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica*, 15(4), 361-367. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95915410>

Narayanan, N., Roychoudhury, P., & Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of biotechnology*, 7(2), 167-179. doi:10.2225/vol7-issue2-fulltext-7

NMX-F-436-SCFI-2011. (2011). Industria Azucarera y Alcoholera Determinación de Grados Brix en Jugos de Especies Vegetales Productoras de Azúcar y Materiales Azucarados Método del Refráctometro. *Norma Mexicana*.

Novoa, C., Núñez, J., Pais, J., Lara, M., & Sánchez, I. (2019). *Obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del Lactobacillus casei*. Tesis de Pregrado, Ibarra. Recuperado el Diciembre de 2020, de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/9776>

Oreopoulou, V., & Russ, W. (2007). *Utilization of by products and treatment of waste in the food industry*. New York: Springer.

- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1), 1-14. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.035
- Pelag, M. (1995). A model of temperature effects on microbial populations from growth to lethality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(1), 83-89. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680114>
- Pescuma, M., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Whey derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6183-6196. doi:10.1007/s00253-015-6766-z
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397-403. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>
- Puzanov, T. (1999). *Continuous production of lactic acid*. Universidad de Toronto , Toronto. Obtenido de <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/13834/1/MQ49724.pdf>
- Ramírez, J. (2012). Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. *Publicaciones e Investigaciones*, 6(1), 69-83. doi:10.22490/25394088.1100
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2015). *Manual de microbiología general* (Primera ed.). Río Cuarto: UniRio Editors. Recuperado el 8 de Noviembre de 2020, de <https://issuu.com/davidandradecontreras/docs/manual-microbiologia-general>
- Rojas, A., Montaña, L., & Basidas, M. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de química*, 44(3), 5-10. doi:DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604>
- Ruiz, P. (2007). La importancia de la producción de leche en el Ecuador . En F. Brassel, & F. Hidalgo, *Libre comercio y lácteos: la producción de leche en*

el Ecuador entre el mercado nacional y la globalización (pág. 37). Quito: SIPAE.

Sánchez, J. (2005). *Potencial Biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados actividad metabólica y producción de exopolisacáridos*. Oviedo. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10261/4796>

Schepersa, A., Thibault, J., & Lacroix, C. (2002). Lactobacillus helveticus growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and microbial technology*, 176-186.

Senthuran, A., Senthuran, V., Hatti-Kaul, R., & Mattiasson, B. (1999). Lactic acid production by immobilized Lactobacillus casei in recycle batch reactor: a step towards optimization. *Journal of biotechnology*, 73(1), 61-70. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00133-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00133-9)

Serna, L., & Rodríguez, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *CYTA - Journal of food*, 5(1), 54-65. doi: <https://doi.org/10.1080/11358120509487672>

Solá, G. (2006). *Estudio de factibilidad para la producción de ácido láctico comercial, a nivel industrial en Guatemala*. Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Soto, B. (2019). *Fermentation Processes*. Reino Unido: ED-Tech Press. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=2ePEDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Steinkraus, K. (1996). *Handbook of indigenous fermented foods*. New York.

Suárez, D. (2007). *Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con Lactobacillus casei ATCC 7469*. Proyecto de grado, Universidad de EAFIT, Medellín. Obtenido de <https://repository.eafit.edu.co/handle/10784/394>

Thakur, A., Singh Panesar, P., & Singh Saini, M. (2018). Parametric optimization of lactic acid production by immobilized lactobacillus casei using box

behnken design. *Periodica polytechnica chemical engineering*, 62(3), 274-285. doi:<https://doi.org/10.3311/PPch.11403>

Trujillo, M., Suárez, F., & Gallegos, D. (1998). Fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteínizado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1), 45-50. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/29984>

Urribarri, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista científica FCV-LUZ*, 14(4), 297-302. Obtenido de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15057/15034>

Valencia, E., & Ramírez, M. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 16(73), 27-31. doi:<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=29411996004>

Valverde, G. (2012). *Influencia del proceso de pasteurización lento de la leche en el rendimiento quesero y en la estabilidad microbiológica*. Guayaquil. Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/21409>

Velasquez, J., Giraldo, G., Padilla, L., & Giraldo, Y. (2015). Crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* atcc 393 en suero clarificado. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 19-27. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117915>

Véliz, I., Gerdtzen, Z., Lienqueo, M., & Valdés, I. (2020). *Estudio del cultivo en perfusión de células pk15 para la producción de vacunas veterinarias y análisis de puntos críticos para su escalamiento*. Tesis de grado, Santiago de Chile. Obtenido de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/177005/Estudio-del->

cultivo-en-erfusion-de-celulas-PK-15-para-la-produccion-de-vacunas-veterinarias-y-analisis-de.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Vijayakumar, J., Aravindan, R., & Viruthagiri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 22(2), 245-264. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Recent-Trends-in-the-Production%2C-Purification-and-Vijayakumar-Aravindan/521a61730f1db38eee6d7969a96b96c486f86da0>
- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2006). Lactic fermentations. En P. Walstra, J. Wouters, & T. Geurts, *Diary science and technology* (págs. 357-385). New York: Taylor & Francis Group.
- Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 10-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>
- Wee, Y., Jin, K., & Ryu, H. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food technology and biotechnology*, 44(2), 163-172. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/228357901_Biotechnological_production_of_lactic_acid_and_its_recent_applications_Food_Technol
- Williams, M. B., & Dueñas, A. (2021). Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero: Antecedentes investigativos y usos tradicionales. *La Técnica Revista de las Agrociencias*, 82-94. doi:<https://doi.org/10.33936/latécnica.v0i0.3490>
- Zacharof, M., Lovitt, R., & Ratanapongleka, K. (2008). Optimization of growth conditions for intensive propagation, growth development and lactic acid production of selected strains of Lactobacilli. *Multidisciplinary Nanotechnology Center*, 1830-1838. Obtenido de https://www.academia.edu/281103/Optimization_of_growth_conditions_f

or_intensive_propagation_growth_development_and_lactic_acid_production_of_selected_strains_of_Lactobacilli?auto=download

Zambrano, C., & Zambrano, J. (2013). *Bebida láctea fermentada utilizando lactosuero como sustituto parcial de leche y diferentes estabilizantes comerciales*. Manabí. Recuperado el 19 de Mayo de 2018, de <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/161/1/Carlos%20Zambrano%20-%20Jorge%20Zambrano.pdf>

Zambrano, D., & López, E. (2018). La industria de lácteos de Riobamba - Ecuador: dinámicas en la economía local. *Economía y negocios*, 9(1), 1-8. doi:<https://doi.org/10.29019/eyn.v9i1.441>

Zhou, Y., Domínguez, J., Cao, N., Du, J., & Tsao, G. (1999). Optimization of L-Lactic Acid Production from Glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. *Applied biochemistry and biotechnology*, 77-79.