

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EMPLEANDO
RESIDUO DE MORA Y SUERO DE LECHE EN SISTEMA DE LOTE.**

ANDREA CRISTINA SOTO MONTES.

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
MEDELLÍN
2015**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EMPLEANDO
RESIDUO DE MORA Y SUERO DE LECHE EN SISTEMA DE LOTE.**

ANDREA CRISTINA SOTO MONTES.

**Trabajo de grado para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial.**

Director

JUÁN CAMILO OVIEDO LÓPERA

Ingeniero de alimentos

Magister en Biotecnología

Doctor en Ciencias Farmaceuticas y Alimentarias

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MEDELLÍN

2015

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

FECHA

ANDREA CRISTINA SOTO MONTES

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad”
Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mi familia, amigos, a la facultad de Ingeniería Agroindustrial, a los grupos de investigación, los diferentes departamentos que con su apoyo de infraestructura, equipos y conocimientos facilitaron este proceso y sin duda a Juan Camilo Oviedo Lopera.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | |
| 1.1. ÁCIDO L(+) LÁCTICO..... | 12 |
| 1.2. MORA DE CASTILLA- <i>Rubus glaucus Benth</i> | 17 |
| 1.3. MORA DE RECHAZO | 19 |
| 1.4. SUERO DE LECHE..... | 19 |
| 1.4.1 Tipos de suero de leche..... | 20 |
| 1.5. BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS (LAB)..... | 22 |
| 1.5.1 <i>LACTOBACILLUS SPP</i> | 22 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 24 |
| 2.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS | 24 |
| 2.1.1 Humedad..... | 24 |
| 2.1.2 Cenizas | 24 |
| 2.1.3 Contenido de azúcares | 25 |
| 2.1.3.1 Contenido de azúcares Mora | 25 |
| 2.1.3.2 Contenido de azúcares suero de leche | 26 |
| 2.1.4 Determinación de proteínas | 26 |
| 2.2 PRE TRATAMIENTO DE LOS SUSTRATOS | 26 |
| 2.2.1 Pre tratamiento de la mora | 26 |
| 2.2.2 Pre tratamiento del suero | 27 |
| 2.3 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO | 27 |

| | Pág. |
|---|------|
| 2.3.1 Mezcla de sustratos | 28 |
| 2.3.2 Adición de suplementos | 28 |
| 2.4 MICROORGANISMO | 29 |
| 2.5 FERMENTACIÓN | 29 |
| 2.5.1 Preparación del preinólulo | 29 |
| Inóculo | 30 |
| 2.5.2 Fermentación en lotes | 30 |
| 2.6 CUANTIFICACIÓN DEL ACIDO LÁCTICO | 31 |
| 2.6.1 Preparación del cloruro férrico | 31 |
| 2.6.2 Cuantificación | 31 |
| 2.7 ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTO..... | 31 |
| 3 ANÁLISIS Y RESULTADOS | 33 |
| 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUTRATOS..... | 33 |
| 3.1.1. Resultados de pruebas de humedad | 34 |
| 3.1.2. Resultados de pruebas de cenizas | 34 |
| 3.1.3. Resultados de prueba de contenido de azúcares | 34 |
| 3.1.4. Resultados de prueba de determinación de proteínas | 35 |
| 3.1.5. Resultados de prueba de pH | 35 |
| 3.2. RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO | 36 |
| 3.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE PRODUCTO..... | 37 |
| CONCLUSIONES | 45 |
| RECOMENDACIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Usos del Ácido Láctico | 13 |
| Figura 2. Concentraciones de ácido láctico para las diferentes mezclas de mora y suero durante 24 horas de fermentación..... | 36 |
| Figura 3. pH 30:70 Vs Tiempo..... | 39 |
| Figura 4. pH 50:50 Vs Tiempo | 39 |
| Figura 5. pH 70:30 Vs Tiempo..... | 40 |
| Figura 6. Porcentaje de reducción de pH 30:70 Vs Tiempo..... | 41 |
| Figura 7. Porcentaje de reducción de pH 50:50 Vs Tiempo | 42 |
| Figura 8. Porcentaje de reducción de pH 70:30 Vs Tiempo | 42 |

LISTA DE TABLAS

Pág.

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Sustratos evaluados en la producción Fermentativa de Ácido Láctico por lote.... | 16 |
| Tabla 2. Producción fermentativa de Ácido Láctico empleando residuos de frutas..... | 16 |
| Tabla 3. Producción fermentativa de Ácido Láctico empleando suero de leche..... | 17 |
| Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de la Mora según su estadio de madurez..... | 18 |
| Tabla 5. Complemento Parámetros fisicoquímicos de la Mora según su estadio de madurez..... | 19 |
| Tabla 6. Composición del suero de leche..... | 21 |
| Tabla 7. Complemento composición del suero de leche | 21 |
| Tabla 8: Mezcla de sustratos..... | 28 |
| Tabla 9: Suplementos adicionales | 29 |
| Tabla 10. Resultados experimentales de la caracterización fisicoquímica..... | 33 |
| Tabla 11. Coeficientes de la ecuación logística de la reducción de pH en el tiempo..... | 43 |
| Tabla 12. Coeficientes de la ecuación logística del porcentaje (%) de reducción de pH en el tiempo..... | 43 |

RESUMEN

El ácido láctico es un compuesto químico ampliamente utilizado en las diferentes industrias. El interés de su producción ha aumentado por su amplia gama de usos especialmente por la obtención de ácido poliláctico en la producción de polímeros biodegradables a partir de éste, estimando una demanda de 367.300 toneladas métricas para el 2017.

El objetivo de esta investigación consiste en evaluar la producción de ácido láctico empleando mora residual y suero de quesería en diferentes mezclas, iniciando con la caracterización de cada uno de los sustratos antes mencionados a través de diferentes pruebas fisicoquímicas; pH, grados Brix, humedad, contenido de azúcares, proteína. Luego se evaluaron mezclas de mora residual y suero de quesería en proporciones mora:suero 30:70, 50:50 y 70:30, como fuente de carbono y energía además de peptona y sales, para la producción de ácido láctico, empleando *Lactobacillus sp.* La medición del ácido láctico se llevó a cabo por medio del cloruro férrico. La mejor concentración para cada una de las mezclas fue $461,068 \pm 0,118$; $884,442 \pm 0,089$ y $845,600 \pm 0,089$ μg Ácido Láctico/L respectivamente. Con la mezcla 50:50 se obtuvieron mejores resultados a las 20 horas del bioproceso. De esta manera se aprovechan los residuos y a partir de los datos obtenidos, se podría realizar una optimización para aumentar la concentración del metabolito producido.

Adicionalmente se realizó un análisis del comportamiento del pH en el tiempo para identificar su reducción como indicador de producción empleando una ecuación logística para analizar los comportamientos.

Palabras clave: Ácido láctico, suero de leche, mora residual, *Lactobacillus sp.*

INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es un producto ampliamente empleado, el interés de su producción se debe a su amplia gama de usos especialmente por la obtención de ácido poliláctico. (Abdel-Rahman, Tashiro, & Sonomoto, 2013)

La producción de ácido láctico presenta un alto costo especialmente representado en la materia prima, con un costo del 34% del total del costo de producción (Wang, Tashiro, & Sonomoto, 2014), por lo cual se ha hecho necesaria la búsqueda de materiales renovables de bajo costo que a su vez contribuya con el medio ambiente.

La principal problemática de la producción biotecnológica de ácido láctico es el elevado costo de tratamiento previo de materiales orgánicos que están siendo utilizados en la actualidad, la mayoría de materiales renovables no son directamente disponibles para la fermentación, otra problemática adicional es la recuperación y purificación del ácido láctico (Wang et al., 2014).

La búsqueda de nuevos materiales renovables se enfoca principalmente en la obtención de fuentes de carbono y nitrógeno determinantes en la obtención de ácido láctico, los residuos agroindustriales han sido determinados como una fuente potencial de sustratos a emplear, dentro de los principales se encuentra el suero de leche por la gran cantidad generada de éste en la industria láctea proveniente de la manufactura de diversos productos. Considerado también una materia prima potente por su contenido de lactosa, grasa, proteínas y otros compuestos esenciales para el crecimiento microbiano.

Los recursos vegetales también se identifican como una fuente de materia prima y en el caso específico de la mora de rechazo representada en el 70% del total

producido a nivel nacional, siendo una alta fuente de residuos que puede ser aprovechada como materia prima en la producción de ácido láctico teniendo en cuenta su contenido de proteínas convirtiéndose en una fuente de carbono y energía.

Los residuos agroindustriales se han convertido en un potencial de estudio para su aprovechamiento debido al gran impacto ambiental y económico a nivel empresarial por la problemática de disposición de los mismos a nivel mundial. (Yepes, Montoya, & Orozco, 2008)

Dentro de las principales aplicaciones estudiadas a los residuos agroindustriales se encuentran la utilización como sustratos fermentables a nivel biotecnológico, en procesos de biodegradación de contaminantes, como fuente de energía en la creación de biocombustibles y como adsorbentes de residuos químicos en aguas principalmente. Uno de los principales retos biotecnológicos consiste en la búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser empleados como sustratos fermentables como fuente de carbono o nitrógeno(Barragán, Tellez, & Laguna Trinidad, 2008).

En la ejecución de este estudio se busca identificar las combinaciones óptimas de los sustratos empleados, realizando procesos de caracterización, producción y cuantificación de la misma.

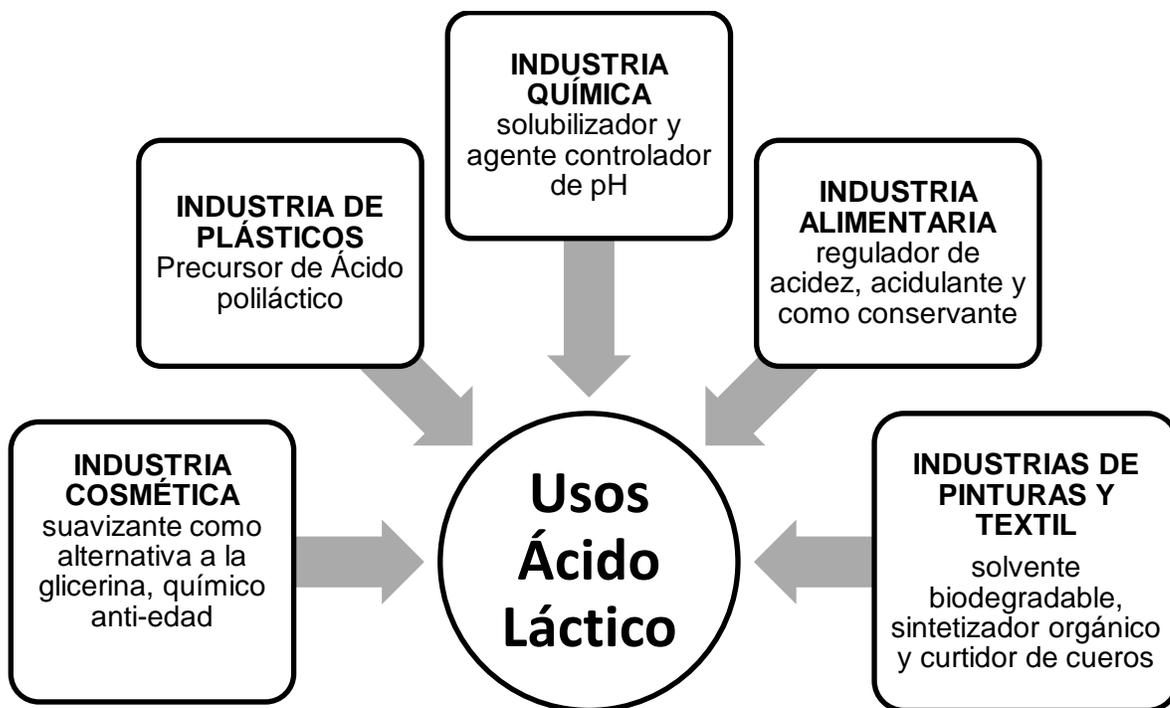
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ÁCIDO L(+) LÁCTICO

El ácido láctico, también conocido como ácido 2 – hidroxipropanoico o ácido α – hidroxipropanoico, se representa por la estructura molecular $C_3H_6O_3$. Este ácido tiene un carbono asimétrico que le permite tener actividad óptica como D(-)láctico y L(+)láctico y formar mezclas racémicas, constituidas por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano. Ambas formas ópticamente activas se encuentran en estado líquido, incoloro y son solubles en agua (SURIDERP, 1995).

El ácido láctico es un componente muy versátil debido al ordenamiento de los grupos constituyentes; grupo carboxilo y grupo hidroxilo, lo que le permite ser utilizado ampliamente en la industria. Además le permite sufrir una serie de conversiones químicas potencialmente útiles en productos químicos como el óxido de propileno, el propilenglicol, ácido acrílico, 2,3-pentanodiona y el éster de lactato.(Serna Cock & Rodríguez de Stouvenel, 2005). El ácido láctico es utilizado principalmente como acidulante, potenciador de sabor, conservante en las industrias farmacéuticas, químicas y de alimentos principalmente, pero la producción de polímeros biodegradables empleando como materia prima el ácido láctico es lo que ha impulsado el mercado del mismo, ya que este es amigable con el medio ambiente y a partir del ácido poliláctico se pueden generar otros productos como fibras y espumas(Abdel-Rahman et al., 2013) . En la figura 1 se encuentran las principales aplicaciones del ácido láctico.

Figura 1. Aplicaciones del ácido láctico



Fuente: (Pozo et al., 2010)

Por la amplia gama de usos y en especial por los productos derivados del ácido poliláctico obtenido a partir del ácido láctico la demanda de este producto ha estimado crecimientos significativos pasando de 267 mil toneladas métricas estimadas para 2012 a 363.300 toneladas métricas estimadas para el 2017 (Abdel-Rahman et al., 2013), identificando un aumento en la demanda de aproximadamente un 37%.

El Ácido láctico puede ser sintetizado por vía biotecnológica o química. El método más común para sintetizar el ácido láctico se basa en la hidrólisis de lactonitrilo (Wang et al., 2014). Este ácido también puede ser producido por medio de la reacción a baja presión entre acetaldehído, agua y monóxido de carbono (CO) usando como catalizador ácido sulfúrico. Las desventajas de este proceso son la síntesis del ácido mezclado con sus isómeros D y L, ocasionando ácido láctico inactivo ópticamente, debido a esto, el 90% del ácido láctico producido en el mundo, se realiza por síntesis biotecnológica (LIPINSKY, 1985; LITCHFIELD, 2010).

A nivel biotecnológico el ácido láctico es obtenido por fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por acción de bacterias y hongos, a diferencia de la obtención por vía química en estos bioprocesos se tiene la ventaja de formar enantiómeros D o L ópticamente activos. La producción biotecnológica de ácido láctico depende del tipo de microorganismo utilizado, la recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el método de fermentación y la formación de subproductos. (Serna Cock & Rodríguez de Stouvenel, 2005).

En el proceso de fermentación, condiciones como el pH, la temperatura y el tamaño del inóculo se consideran factores importantes para el crecimiento celular, la concentración de ácido láctico, la productividad de ácido láctico y rendimiento de ácido láctico (Abdel-Rahman et al., 2013).

La relación de fuente de carbono a fuente de nitrógeno (relación C / N) es un factor importante que afecta el proceso de conversión de ácido láctico. Generalmente, una relación C / N adecuada, lograda por la adición de fuentes de nitrógeno complejas tales como extracto de levadura, peptona y extracto de carne, tiene un efecto positivo en la producción de ácido láctico. En particular, extracto de levadura es un nutriente eficiente para alta producción de ácido láctico por bacterias ácido lácticas (LAB), aunque la utilización de los resultados de extracto de levadura en un alto costo de producción de ácido láctico. Por lo tanto, la sustitución de extracto de levadura con una fuente de nitrógeno alternativa económica sería reducir el costo de nutrientes. (Wang et al., 2014)

La fase de crecimiento del inóculo es un factor importante en la producción de ácido láctico, cuando se encuentra en fase de crecimiento exponencial se reportan crecimientos inmediatos sin retrasos, mientras que aquellos inóculos en fase estacionaria presentan una etapa de adaptación al crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento depende del microorganismo, para el caso específico de los *Lactobacillus sp* se encuentra entre los 20 y 45 °C en anaerobiosis y con un pH inicial óptimo de 7 y presentando cese en el proceso fermentativo a pH inferior a 4,5 (Rios Castro, 2011).

Los residuos agroindustriales pueden ser fuente de compuestos químicos como azúcar, pigmentos, fibra alimentaria, proteína, polifenoles, lignina entre otros. Lo cual los puede hacer potencialmente útiles a través de transformaciones químicas y microbiológicas para la obtención de productos con valor agregado. Se han adelantado estudios en la búsqueda de nuevos sustratos de bajo costo para la producción de Ácido láctico. A continuación en las tablas 1, 2 y 3 , se muestran algunos de los sustratos evaluados a nivel mundial para la producción de Ácido láctico por lote, empleando residuos de frutos y suero de leche respectivamente.

Tabla 1. Sustratos evaluados en la producción fermentativa de ácido láctico por lote.

| Sustrato | Microorganismo | Obtención de Ácido Láctico (g/L) |
|------------------------------|---|----------------------------------|
| Almidón de sagú | <i>Enterococcus faecium</i> No. 78 | 6,6 ± 0,8 |
| Hidrolizado de Madera | <i>E. faecalis</i> RKY1 | 93,0 |
| salvado de trigo hidrolizado | <i>Lactobacillus bif fermentans</i> DSM 20003 T | 62,8 |
| Mazorca de maíz | <i>L. brevis</i> S3F4 | 39,1 |
| Residuos de mazorcas | <i>L. delbrueckii</i> ZU-S2 | 48,7 |
| Orujo de manzana | <i>L. rhamnosus</i> CECT-288 | 32,5 |
| Arroz y salvado de trigo | <i>Lactobacillus</i> sp. RKY2 | 129 |
| Bagazo de caña de azúcar | <i>Lactococcus lactis</i> IO-1 | 10,9 |

FUENTE: (Wang et al., 2014)

Tabla 2. Producción fermentativa de ácido láctico empleando residuos de frutas.

| Residuo empleado | Tipo de fermentación | Microorganismo | Obtención de Ácido Láctico (g/L) | Bibliografía |
|------------------|----------------------|--|----------------------------------|---|
| Cáscara de mango | Lote | LAB | 17,484 | (Jawad, Alkarkhi, Jason, Easa, & Nik Norulaini, 2013) |
| Mora residual | Lote | <i>Lactobacillus</i> spp | 15,055 | (Agudelo Herrera, 2011) |
| Residuos de piña | Lote | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9646 | 17,65 | (Idris & Wahidin, 2006) |

Tabla 3. Producción fermentativa de Ácido Láctico empleando suero de leche.

| Tipo de fermentación | Microorganismo | Obtención de Ácido Láctico (g/L) | Bibliografía | Características |
|-----------------------------|---|---|---|----------------------------------|
| Lote | <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 | 1,1 | (M & P, 2013) | Desproteización por filtración |
| Lote | <i>Lactobacillus casei</i> NBIMCC 1013 | 33,73 | (Kosseva, 2010) | Desproteización por filtración |
| Lote | <i>Lactobacillus casei</i> & <i>Lactobacillus sp</i> | 16 | (Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko, 2007) | Sistema de células inmovilizadas |
| Continuo | <i>Lactobacillus casei</i> & <i>Lactobacillus sp</i> | 14,8 | (Panesar et al., 2007) | Sistema de células inmovilizadas |
| Continuo | <i>Lactobacillus helveticus</i> | 19-22 | (Schepers, Thibault, & Lacroix, 2006) | Permeato de suero |
| Lote | <i>Lactobacillus helveticus</i> | 10 | (Tango & Ghaly, 1999) | Suero ultra filtrado |

1.2. MORA DE CASTILLA- *Rubus glaucus Benth*

Fruto proveniente de un arbusto de vegetación perenne y longitud variable, es una fruta poli drupa dentro de la cual se encuentran las semillas. Las drupas que contiene pueden ser de forma redonda o alargada, que agrupadas forman la longitud total de la Mora de Castilla, la cual varía entre 1 y 3 cm. Dado que su

floración no es homogénea, ésta madura de manera dispareja, colorando desde rojo a púrpura. Especie común en las tierras frías (11-18°C) desde 1.800 y 2.500 m.s.n.m. (Franco, 2000).

La mora de castilla se encuentra principalmente en Ecuador, Perú, Colombia, Panamá, Salvador, Honduras, México y Estados Unidos. La producción de mora en el año 2009 muestra que el mayor productor en Colombia es el departamento de Cundinamarca con 35.000 toneladas, le siguen Santander con 15.000 toneladas, Antioquia con 10.500 toneladas y Huila con 9.000 toneladas. Para el año 2020, se espera un aumento de 10.000 hectáreas nuevas y un total de 104.265 toneladas de mora cosechada. Los principales países abastecedores de mora fresca al mercado de los Estados Unidos son: Chile 85,6%, Guatemala 5,2%, Nueva Zelanda 4,6% y Colombia 3,4%. (Barreo, 2009; Agronet, 2010). En las tablas 4 y 5 se reportan los parámetros fisicoquímicos de la mora según su estadio de madurez.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de la Mora según su estadio de madurez

| Parámetro | Grado de maduración | | | | | |
|---------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Humedad % | 86,53 | 86,17 | 85,05 | 86,89 | 86,42 | 88,76 |
| Grados Brix % | 1,41 | 1,3 | 1,57 | 2,15 | 2,8 | 3,57 |
| pH | 2,8 | 2,67 | 2,66 | 2,71 | 2,65 | 2,88 |
| Cenizas % | 0,42 | 0,42 | 0,46 | 0,53 | 0,42 | 0,85 |

FUENTE:(Ayala & Valenzuela, 2013)

Tabla 5. Complemento Parámetros fisicoquímicos de la Mora según su estadio de madurez

| Parámetro | Grado de maduración | | | | | |
|---------------|---------------------|------|------|-----|------|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Proteína % | - | 8,06 | 7,58 | 6,3 | 6,18 | - |

FUENTE: (Farinango, 2010)

1.3. MORA DE RECHAZO

De acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC 4106 del 16 de Abril de 1997, expedida y editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación – ICONTEC -; la mora de rechazo es aquella que no cumple con las características y especificaciones allí expuestas, dependiendo de los parámetros de Diámetro, Forma, Peso Total, contenido de Sólidos Solubles Totales (°Brix), Acidez Titulable, Índice de madurez; entre otras.(Icontec/ instituto colombiano de normas técnicas y certificación, 1997)

1.4. SUERO DE LECHE

La industria láctea representa un importante sector de la industria alimentaria y su contribución material en términos de contaminación de las aguas receptoras es significativa. El suero como subproducto proviene de la coagulación de la leche durante la fabricación de quesos. Es un líquido compuesto principalmente de agua, materia grasa, lactosa, proteínas y minerales. Constituye además el problema más difícil de resolver respecto al tratamiento de aguas residuales de la industria láctea

y se estima entre el 60% y 70% de la carga orgánica total de los efluentes provenientes de la industria láctea corresponde a suero(Corrêa et al., 2014).

De un kilogramo de leche pueden obtenerse 100 gramos de queso; el 90% restante corresponde a suero, el cual posee una alta concentración de materia orgánica. Este factor puede medirse de manera indirecta mediante la DQO, a través de la cual se conoce la cantidad de material susceptible de oxidarse por medios químicos en una muestra líquida. La demanda biológica de oxígeno DBO, que en los efluentes industriales tiene una variación entre 40 y 10000 mg/ l, mientras que el agua residual doméstica tiene una concentración de DQO de 350 a 400 mg O₂/L, la DQO del suero se encuentra entre 70.000 y 80.000 mg O₂/L, es decir, 2000 veces más, haciéndola más difícil y costosa para tratar(Cecodes, 2009; Arango y Sánchez, 2009; Serna, 2005).

Debido a su potencial contaminante, la disposición de suero de leche no tratada ha sido severamente restringida, impulsando a la industria láctea a la búsqueda de prácticas alternativas de manejo. Entre las diferentes estrategias, el suero de leche puede ser utilizado en la alimentación suplementaria del ganado; el riego de suelos y pastos para la agricultura; como una fuente de lactosa y proteínas de los alimentos y aplicaciones industriales; en la producción de combustible (tales como etanol, hidrógeno, metano) y obtención de bioproductos a través de tecnologías de fermentación; entre otros (Corrêa et al., 2014).

1.4.1. Tipos de suero de leche

El tipo y la composición de suero de leche en las plantas lecheras depende principalmente de las técnicas de procesamiento utilizadas para la eliminación de la caseína de la leche líquida. El tipo más frecuentemente encontrado de suero de leche se origina a partir de la fabricación de queso o caseína. En general, el suero producido a partir de quesos de cuajo-coagulado es bajo en acidez, mientras que la

producción de quesos frescos, tales como ácido ricotta o cottage rendimientos queso ácido medio o de suero ácido.(Panesar et al., 2007). En las tablas 6 y 7 se reporta la composición del suero de leche ácido.

Tabla 6. Composición del suero de leche

| Componentes | Suero dulce de leche (g /L) | Suero ácido (g / L) |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Solidos totales | 63-70 | 63-70 |
| Lactosa | 46-52 | 44-46 |
| Proteína | 6-10 | 6,8 |
| Calcio | 0,4-0,6 | 01,02 a 01,06 |
| Fosfato | 1-3 | 2-4,5 |
| El lactato | 2 | 6,4 |
| Cloruro | 1,1 | 1,1 |

Fuente(Panesar et al., 2007)

Tabla 7. Complemento Composición del suero de leche

| Componentes | Suero dulce de leche (g /L) | Suero ácido (g / L) |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Humedad | 93,1 | 93,1 |
| Cenizas | 0,52 | 0,6 |
| pH | 6,1 | 4,7 |

Fuente (Analítica, 2008)

1.5. BACTERIAS ÁCIDOLÁCTICAS (LAB)

Las bacterias ácidolácticas constituyen un grupo diverso de microorganismos Gram-positivos que existen dentro de las plantas, la carne y los productos lácteos y pueden producir ácido láctico como un producto de la glicólisis anaeróbica con alto rendimiento y alta productividad. Las condiciones óptimas de crecimiento varían dependiendo de los productores, ya que estas bacterias pueden crecer en el intervalo de pH de 3,5-10,0 y la temperatura de 5-45 ° C. (Abdel-Rahman et al., 2013)

Las LAB generalmente tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada capacidad de sintetizar elementos para su propio crecimiento. Mientras que las fuentes de carbono se utilizan para generar energía para la proliferación, las LAB requieren otros nutrientes tales como fuentes de nitrógeno, vitaminas y minerales para el mantenimiento, crecimiento celular, y la secreción de ácido láctico.

1.5.1. *LACTOBACILLUS SPP*

El *Lactobacillus spp* es uno de los géneros más importantes perteneciente al grupo de bacterias ácido lácticas (LAB) debido al especial uso que se le ha dado en la industria alimentaria tanto para desarrollar alimentos funcionales como en bioconservación (Vanegas, Martínez, & González, 2011).

El género *Lactobacillus spp* lo comprenden bacterias de forma bacilar de 0,5 - 10,0 µm, comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobias facultativas ó microaerófilas. Excepcionalmente pueden poseer motilidad, se mueven ayudados por flagelos peritricos. Los *lactobacillus* son auxótrofos quimioorganotróficos porque necesitan medios complejos para su crecimiento, degradan la sacarosa para producir lactato. La temperatura óptima de crecimiento de los *Lactobacillus* se encuentra entre 25 – 40 °C. Su hábitat natural es variado, pudiéndolos encontrar en

el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, y en alimentos de origen vegetal y animal.(Rios Castro, 2011)

Generalmente las especies de esta bacteria, fermentan la glucosa en lactato y productos adicionales como acetato, etanol y dióxido de carbono, dependiendo del *Lactobacillus*; no producen ácidos volátiles. El uso más común del *Lactobacillus spp*, es en la industria láctea, por su papel esencial en las cualidades organolépticas, consistencia, probióticas e incluso higiénicas de los derivados lácteos, de los cuales es precursor. Debido a su capacidad de derivar el ácido láctico a partir de la glucosa, estas bacterias crean un ambiente ácido que inhibe el crecimiento de especies bacterianas que pueden conducir a infecciones o enfermedades; así, el *Lactobacillus spp* es generalmente inofensivo a los seres humanos.

Actualmente, la tendencia por el consumo de alimentos funcionales despierta el interés en la industria alimentaria el introducir en sus alimentos cepas de *Lactobacillus spp* por sus características probióticas y en bioconservación(Vanegas et al., 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

La mora de rechazo y suero de quesería empleados como sustratos, fueron obtenidos de cultivos pertenecientes a PROTEAGRO ubicados en el Oriente Antioqueño y la empresa de productos lácteos “Buenavista” respectivamente. Fueron caracterizados empleando pruebas físico químicas; porcentaje de cenizas, contenido de azúcares y determinación de proteínas.

2.1.1. Humedad

La prueba se realizó con moras de aproximadamente 5.5 a 6.2 g previamente trituradas y un volumen aproximado de 5 ml de suero de leche. Las muestras fueron dispuestas en cápsula de porcelana previamente secadas, taradas y rotuladas. Posteriormente fue secada a 70°C en un horno de convección forzada marca WT Binder por tiempos entre 24 ,36 y 72 horas y a una presión atmosférica de 664 mmHg hasta alcanzar un peso constante. Se llevaron a un desecador hasta lograr un enfriamiento apto para la toma de peso total referenciado en AOAC 925.10 de 1997. Para determinar los porcentajes materia seca y porcentaje de humedades obtenidas, se recurrió a las ecuaciones 1 y 2.

Ecuación 1

$$\% \text{ Materia seca} = \frac{\text{Peso de la muestra seca}}{\text{Peso de la muestra humeda}} \times 100\%$$

Ecuación 2

$$\% \text{ Humedad} = 100\% - \% \text{Materia seca}$$

2.1.2. Cenizas

El procedimiento fue realizado basado en la Norma AOAC 923.03 de 1997 donde se pesaron cantidades entre 5 y 13 g de la muestra, dispuesta en crisoles en una mufla (horno de alta temperatura JOB) con controlador de temperatura a 550 °C por 5 horas. Después de apagada la mufla y enfriada a 220°C, se sacó la muestra y se introdujo en un desecador, posteriormente se pesó la muestra, y se encontró el porcentaje de cenizas por diferencia de pesos, tal como se muestra en la Ecuación 3.

Ecuación 3

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{Peso de la ceniza}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100\%$$

2.1.3. Contenido de azúcares

Para la determinación del contenido de azúcares se emplearon métodos para cada uno de los sustratos, en el caso de la mora se evaluó en términos de grados Brix (°Brix) mientras que en el suero de leche se identificaron los azúcares en términos del contenido de lactosa empleando el método de Dubois.(Moreno & Crespo, 2010)

2.1.3.1 Contenido de azúcares Mora

El contenido de azúcares se determinó por medición de °Brix con un refractómetro digital marca B&C utilizando agua destilada como blanco. Para esta prueba, la fruta se fraccionó en 3 partes y se trituró en un mortero limpio y seco.

2.1.3.2 Contenido de azúcares en el suero de leche

Se evaluó la cantidad de lactosa presente empleando el método de Dubois que consiste en la extracción con agua destilada de los azúcares solubles. El derivado formado entra en procesos de protonación/desprotonación debido al medio fuertemente ácido.(Moreno & Crespo, 2010). Se tomo 1 ml de la muestra líquida (suero de quesería) a la cual se le añadió 1ml de fenol al 5% y 5ml de H₂SO₄ (directamente, sin dejar correr por las paredes) para luego llevar a baño maría por 15 min, posteriormente se sumergió en agua con hielo durante el mismo tiempo y finalmente se realizó la lectura con un espectrofotómetro UV visible a 490 nm.

2.1.4. Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se hizo necesaria la maceración de la mora con el fin de obtener un contenido líquido de dicho sustrato para emplear de forma óptima el método de Biuret (Anexo A).

Se tomaron 0,5ml de la muestra en un tubo de ensayo, luego se adicionaron 0,5ml de Biuret (preparado previamente), se dejó reposar por 30 min y finalmente se realizó una lectura en un refractómetro a 540 nm.

2.2. Pre tratamiento de los sustratos

Cada uno de los sustratos empleados (mora residual y suero de leche) recibió un tratamiento diferente para garantizar el óptimo aprovechamiento de los mismos.

2.2.1.1. Pre tratamiento de la mora

La mora de rechazo fue sometida a un proceso de extracción del jugo a través de procesos de centrifugación y filtración.

Al recibir la mora, ésta fue pesada y procesada con agua en una proporción 3:1 (mora: agua) en una licuadora Osterizer de 3 velocidades y finalmente fue filtrado a través de un cedazo para la obtención del jugo.

2.2.2. Pre tratamiento del suero

El suero de leche fue sometido a un proceso de desproteínización; esto se logró precipitando las proteínas séricas.

Se tomó la cantidad adecuada de suero para realizar un proceso desproteínizado de manera tal que se pudiera sacar la cantidad necesaria para el ensayo (10% más del establecido en la tabla 8) Posteriormente y de forma simultánea se realizó una medición de pH y la disminución del mismo a pH 4,5 con ácido fosfórico.

Una vez regulado el pH del suero de leche se procedió a calentar hasta 90 °C durante 5 min en una plancha de calentamiento y con la ayuda de un termómetro se garantizó el calentamiento hasta la temperatura antes mencionada.

Finalmente el suero se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego ser filtrado con la ayuda de una bomba de vacío empleando un papel filtro de 150 mm.

2.3. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Una vez realizados los procedimientos de los ítems 2.2.1.1 y 2.2.2.1 la preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo realizando tres mezclas diferentes de fuentes de carbono y energía procedentes de los residuos pre tratados (mora residual y suero de leche), con un volumen total en cada mezcla de 500 ml.

2.3.1. Mezcla de sustratos

Las mezclas y proporciones volumétricas se muestran a continuación en la tabla 8. Se eligieron dichas combinaciones por tratarse de una investigación preliminar donde se desean evaluar grandes rangos de concentraciones para posteriormente ser disminuidos.

Tabla8. Mezcla de sustratos.

| Mezcla Número | Extracto de Mora | | Suero de quesería | |
|---------------|------------------|-----|-------------------|-----|
| | % | ml | % | ml |
| 1 | 70 | 350 | 30 | 150 |
| 2 | 50 | 250 | 50 | 250 |
| 3 | 30 | 150 | 70 | 350 |

Cada una de las mezclas se realizó con la ayuda de una probeta garantizando la cantidad de suero y mora pre tratados necesarios en las mezclas correspondientes, para proceder a la adición de suplementos.

2.3.2. Adición de suplementos

A cada una de las mezclas mencionadas en la anterior tabla, se le adicionaron como fuente de nitrógeno extracto de levadura y minerales necesarios para el metabolismo de las bacterias ácido lácticas, como aparecen en la tabla 9.

Tabla 9. Suplementos adicionales

| Elemento menor | g/L |
|---------------------------------|------------|
| Extracto de levadura | 10 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,15 |
| MgSO ₄ | 0,3 |
| FeSO ₄ | 0,03 |
| MnSO ₄ | 0,03 |

Fuente: (Agudelo Herrera, 2011)

La adición de los suplementos previamente pesados se realizó manteniendo las soluciones en agitación constante, luego se ajustaron las mezclas a pH neutro (pH: 7) con una solución de NaOH simultáneamente verificado con la ayuda de un pHmetro.

2.4. Microorganismo

Se empleó el *Lactobacillus spp*, almacenado y mantenido en el laboratorio de microbiología del Centro de Estudios e Investigación en Biotecnología, CIBIOT. El microorganismo se mantuvo medio sólido, Agar nutritivo.

2.5. Fermentación

2.5.1. Preparación del preinoculo

Se pesaron 2,13 gr de caldo M-17 y se disolvieron en 50ml de agua destilada para cada una de las mezclas (70:30, 50:50, 30:70). Luego se dividió en dos Erlenmeyer de 25ml, se taparon con algodón y papel aluminio y se llevaron a esterilización en una autoclave a 121°C durante 20 minutos y finalmente el caldo M17 se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente.

2.5.2. Inóculo

En una cámara de flujo laminar y con ayuda de un asa estéril se pasaron las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus spp* previamente sembradas en agar nutritivo a uno de los Erlenmeyer de 25 ml de caldo M17; el caldo se llevó a un agitador orbital entre 80 y 100 rpm durante 12 horas.

2.5.3 Fermentación en Lotes

En el proceso de fermentación se realizó el análisis para un total de 12 muestras para cada una de las mezclas de sustratos expuestas en la tabla 5 por triplicado. Cada proceso de fermentación se llevó a cabo en dos días de la siguiente forma:

Una vez realizados los procesos de los ítems 2.3.1, 2.3.2, 2.5.1 y 2.5.2 se utilizaron 12 Erlenmeyers de 50 ml de capacidad, adicionando en cada uno 35 ml de medio, de los cuales 6 fueron inoculados el primer día a las 6am introduciéndolos dentro de la cámara de inoculación previamente esterilizada, se tomó una muestra de 5 ml de cada Erlenmeyer, luego se adicionaron 4 ml del caldo M17 inoculado 12 horas antes, se generó llama con papel kraf esterilizado garantizando anaerobiosis desplazando el aire con el humo y se tapó con algodón y aluminio, este paso se realizó con los otros 5 medios sin realizar la toma de muestra. Finalmente se realiza el proceso del ítem 2.5.2 con el segundo Erlenmeyer de 25 ml de caldo M17.

Los Erlenmeyer fueron colocados en agitación a 90 rpm y cada dos horas se retiró uno de la agitación, se tomaron 10 ml de muestra y se distribuyeron en dos tubos de ensayos plásticos con tapa que fueron llevados a centrifugación por 6 min a 600rpm, simultáneamente al resto del medio se le midió el pH y luego fue descartado en la zona de residuos peligrosos del CIBIOT. Una vez terminado el proceso de centrifugación se separó el sobrenadante y fue llevado a refrigeración debidamente rotulado. El precipitado fue retirado por reconstitución en agua.

Este procedimiento fue repetido en cada medio cada dos horas con un total de doce horas de evaluación el primer día, una vez tomada la última muestra se realizó el

proceso de inoculación de los otros 6 medios con el caldo M17 inoculado en la mañana dejando en agitación durante toda la noche y se tomó la primera muestra pasadas 14 horas desde la inoculación de igual forma que en los 6 primeros medios.

2.6. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Para la cuantificación de ácido láctico se empleó el método de cloruro férrico.

2.6.1. Preparación del cloruro férrico

Se pesaron 2 gr de cloruro férrico (FeCl_3) y se adicionaron 0,4ml de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N y se aforó hasta 20 ml con agua destilada (Anexo B)

2.6.2. Cuantificación

Se tomaron 0,5 ml de muestra (sobrenadante) y se diluyó con agua destilada en un balón volumétrico de 50 ml, se tomaron 2 ml de dicha solución diluida y se adicionó a un tubo de ensayo, luego se agregó 1 ml de cloruro férrico y se aforó hasta 10 ml con agua destilada, se dejó reaccionar entre 15 y 20 minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 440 nm.

2.7. ANALISIS DE LA PRODUCCIÓN DE PRODUCTO.

Se analizó el comportamiento del pH evaluando el porcentaje (%) de reducción y su cambio en el tiempo. Con el objetivo de establecer una cinética indirecta o un comportamiento indirecto del crecimiento celular mediante la producción de ácido láctico. Para cada una de las combinaciones de los medios se realizó el estudio por triplicado y una validación.

Los datos de la cinética se evaluaron a través de un modelo logístico, los cuales fueron procesados en el software Python a través de una de sus plataformas de optimización y con el cftool de Matlab. Con dichos análisis se obtuvieron los

coeficientes para las ecuaciones (ecuaciones logísticas) y las correlaciones de ajuste al modelo.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

En la tabla 10 se encuentran los resultados experimentales de la caracterización fisicoquímica de los sustratos.

Tabla 10. Resultados experimentales de la caracterización fisicoquímica

| Pruebas | Mora | Suero |
|-------------------|-------------|--------------|
| Humedad (%) | 86,64 | 94,04 |
| Cenizas (%) | 0,04 | 0,01 |
| Azúcares (°Brix) | 6,6 | NA |
| Lactosa (%) | NA | 0,02878 |
| pH | 2,94 | 6,7 |

Teniendo en cuenta los reportes bibliográficos se pudo identificar que la mora de rechazo empleada se encontraba en estadio 5 y 6 de maduración, con un alto reporte de °Brix y bajo % de cenizas de acuerdo lo expuesto por Ayala y Valenzuela en 2013.

En el caso del suero de leche se pudo determinar que el suero empleado era suero dulce debido a su nivel de pH con un bajo porcentaje de lactosa frente a los reportados en la bibliografía.

3.1.1. Resultados de pruebas de humedad

El contenido de humedad en un alimento o residuo agroindustrial, como es el caso de los sustratos evaluados hace referencia al contenido de agua total presente o agua libre, es decir que se encuentra disponible para reaccionar químicamente con otras sustancias y provocar crecimiento microbiano (Iberfluid & Rotronic, 2008).

Los medios de cultivos empleados en los procesos de fermentación deben garantizar los factores de crecimiento adecuados, dentro de los cuales la humedad del mismo es un factor determinante.

La humedad se determinó empleando los pesos promedios de las muestras iniciales y la muestra seca en cada uno de los sustratos, obteniendo como resultado % de humedad en la mora de 86,64% lo que permitió clasificarla en un estadio de maduración 5 teniendo en cuenta el reporte realizado por Ayala y Valenzuela en 2013 con un %Humedad de 86,42 en dicho estadio. En el caso del suero de leche se determinó el % Humedad del 94,04 mientras que la bibliografía reporta un 93,1%, lo cual permite identificar que los métodos empleados arrojan resultados certeros.

3.1.2. Resultados de pruebas de cenizas

El contenido de cenizas hace referencia al material orgánico presente, principalmente minerales. Dentro del estudio realizado se encontró que la mora evaluada presentó un % de ceniza de 0,04 una diferencia significativa respecto al reporte de Ayala y Valenzuela en 2013. Así mismo, al evaluar el porcentaje de cenizas en el suero se puede identificar una diferencia significativa entre el reporte de Analítica en 2008 y el obtenido experimentalmente con valores de 0,60% y 0,01%, respectivamente.

Estas diferencias significativas se atribuyen a los estados de conservación de los sustratos, teniendo en cuenta que antes de ser entregados para las respectivas valoraciones no se encontraban en condiciones adecuadas de conservación.

3.1.3. Resultados de prueba de contenido de azúcares

La evaluación del contenido de azúcares se llevó a cabo empleando diferentes evaluaciones a cada uno de los sustratos, expresados en grados Brix para la mora y en contenido de lactosa para el suero.

En el caso de la mora se encontró que contenía 6,6 grados Brix un contenido elevado respecto al reportado por Ayala y Valenzuela en 2013 y al encontrado en el estudio de Agudelo en 2011 reportando 2,3 y 5,06 respectivamente, pero en dicho estudio también se puede identificar que el contenido de grados Brix tiende a aumentar de acuerdo al grado de maduración, si bien la mora evaluada se había identificado en un estadio de maduración cinco (5) en este caso particular del contenido de azúcares, se identifica que se encuentra en un estado mucho mayor de maduración entendible a su condición de mora de rechazo.

Para el suero se identificó que el contenido de lactosa fue de 28,78 mg/L un contenido significativamente bajo respecto al reportado por Panesar en 2007 de 46-52 g/L para suero dulce. Esta diferencia determinante pudo ser a causa de los cambios térmicos y en general a los factores de conservación que se sometió el suero causando la degradación del mismo.

3.1.4. Resultados de prueba de determinación de proteínas

El resultado de determinación de proteínas fue de 6,26 g/L para la mora y 5,07 g/L para el suero de leche. Ambos resultados encontrados se encuentran cercanos a los reportados de 6 -10 para suero de leche dulce y 6,18 para la mora en estadios altos de maduración.

3.1.5. Resultados de prueba de pH

El resultado de pH para cada uno de los sustratos permitió identificar y/o ratificar el estadio de maduración en la mora y tipo de suero, arrojando un pH de 2,94 en la mora y reportado por Ayala y Valenzuela en 2,88 para un estadio de maduración, mientras que el suero de leche experimentalmente indicó un pH de 6,7 respecto al referenciado de 6,10 identificándolo como un suero dulce.

3.2. Resultados de la cuantificación de ácido láctico

En la Figura 2 aparecen los resultados de las concentraciones de ácido láctico (μg ácido láctico/L) desde las 4 a las 24 horas del bioproceso.

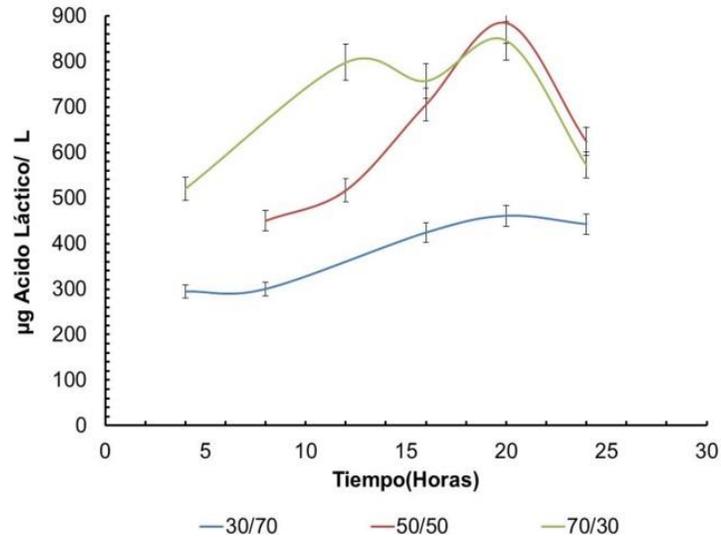


Figura 2. Concentraciones de ácido láctico para las diferentes mezclas de moro y suero durante 24 horas de fermentación.

El método de cloruro férrico arrojó que la concentración máxima de ácido láctico, para todos los ensayos se obtiene transcurridas 20 horas de fermentación en concentraciones $461,068 \pm 0,118$; $884,442 \pm 0,089$ y $845,600 \pm 0,086$ μg ácido láctico/L en los ensayos 30:70, 50:50 y 70:30 (moro - suero), respectivamente. Obteniendo mejores resultados en la mezcla 50:50 a las 20 horas del bioproceso.

Aunque la mezcla 50:50 fuera la mejor en el proceso de fermentación respecto a otras investigaciones está bastante bajo el resultado obtenido. En otras investigaciones con suero de leche con una producción de $33,73$ g/L, en un periodo de 36 horas, con pH 6,5, empleando *Lactobacillus casei* y un contenido inicial de lactosa en el suero del 4% (Koseeva, 2010), sin embargo, en investigaciones con lactosuero han identificado la disminución del contenido de nitrógeno obteniendo

resultados de producción de 1,1g/L (M & P, 2013), bastante bajo respecto al anteriormente mencionado.

En investigaciones con residuos de origen vegetal como la cáscara de mango, se obtuvo una producción de 17.484 g/L, en un periodo de 144 horas (6 días) y pH 10. (Jawad, Alkarkhi, Jason, Easa, & Nik Norulaini, 2013).

En otra investigación con residuos vegetales, empleando piña como sustrato se obtuvieron resultados de 5,9 g/L de ácido láctico, en un periodo 36 horas (2.5 días) y la adición de glucosa.(Marrugo & Baena, 2010)

A nivel general teniendo en cuenta las investigaciones antes mencionadas se puede observar que los tiempos de fermentación en dichas investigaciones son mas largos, los pH en el uso de suero de leche y cascara de mango fueron controlados, lo cual es un factor determinante para el crecimiento e interacción del microorganismo y en el caso particular de la piña la adición del azúcar sintético puede ser un complemento diferenciador.

Teniendo en cuenta que 4 mol de ácido láctico debe ser producido a partir de 1 mol de lactosa (Wang et al., 2014) y los contenidos bajos de lactosa identificados en la evaluación de azúcares con un contenido de 0,028% respecto al 4% del contenido inicial reportado en el estudio reportado por Koseeva en 2010, se puede determinar esta como una de las razones del bajo contenido de ácido láctico obtenido en el proceso.

3.3. Resultados del análisis de la producción de producto.

Se realizó la evaluación indirecta de la cinética de crecimiento con el objetivo de conocer la formación de producto obtenida en cada uno de los medios evaluados, se realizó mediante la evaluación del pH, teniendo en cuenta que la reducción de este es un indicador determinante de la activación de los microorganismos.

Se evaluaron diferentes modelos para determinar cual se ajustaba mejor al comportamiento del crecimiento y/o proceso de producción de ácido láctico de

acuerdo al comportamiento del pH. El criterio de selección para escoger el modelo fue el r^2 AJUSTADO. Luego de los análisis de optimización en el software pýthon el modelo que mejor se ajustó fue el modelo de crecimiento logístico (Verhulst), basado en que la tasa de crecimiento es proporcional al tamaño de la población momentánea y la fracción de recursos existentes en el hábitat (Peleg, Corradini, & Normand, 2007). El modelo logístico ha sido empleado para crecimiento de poblaciones, propagación de enfermedades, modelos de adopción agregada y la cuantificación de biomasa en bioprocesos (Oviedo, Casas, Valencia, & Zapata, 2014). Modelo que se explica en la ecuación número 4 la cual sufre algunas modificaciones de acuerdo al ajuste matemático, cambios de variables y comportamiento, generando la Ecuación número 5.

Ecuación 4

$$x(t) = \frac{\beta_1}{1 + \exp(\beta_2 + \beta_3 * t)}$$

Ecuación 5

$$f(x) = \frac{a_1}{(1 + b_1 * \exp(c_1 * x))} + \frac{a_2}{(1 + b_2 * \exp(c_2 * x))}$$

En las figuras 3,4 y 5 se muestra el comportamiento del pH en el tiempo de evaluación del proceso fermentativo en las diferentes combinaciones evaluadas; 30:70, 50:50 y 70:30 (Mora: suero), respectivamente.

Figura 3. pH 30:70 Vs Tiempo

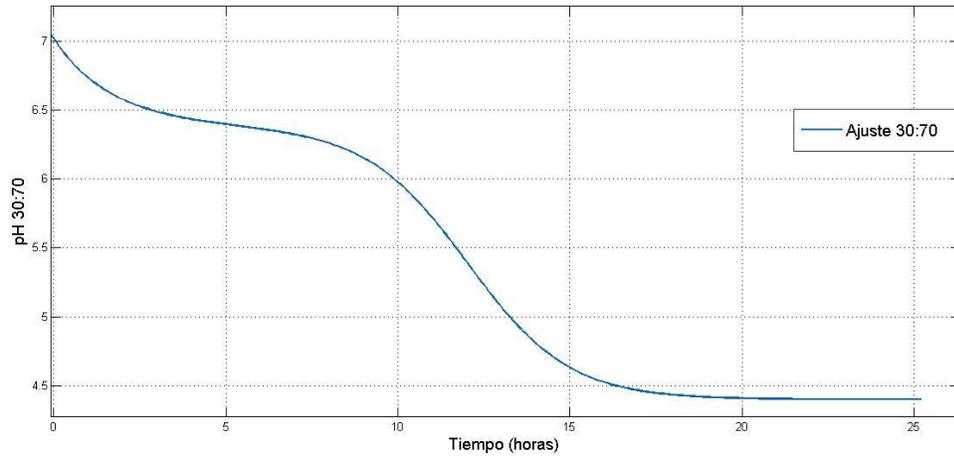


Figura 4. pH 50:50 Vs Tiempo

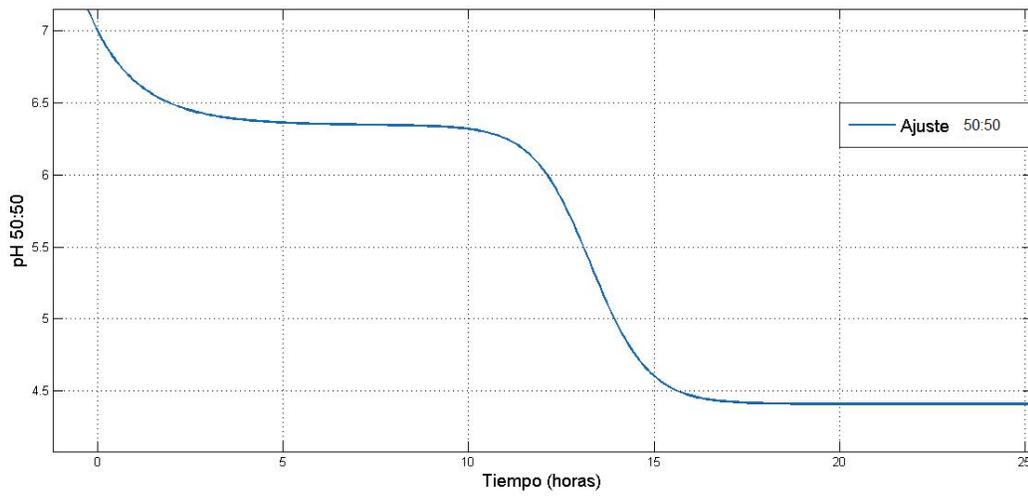
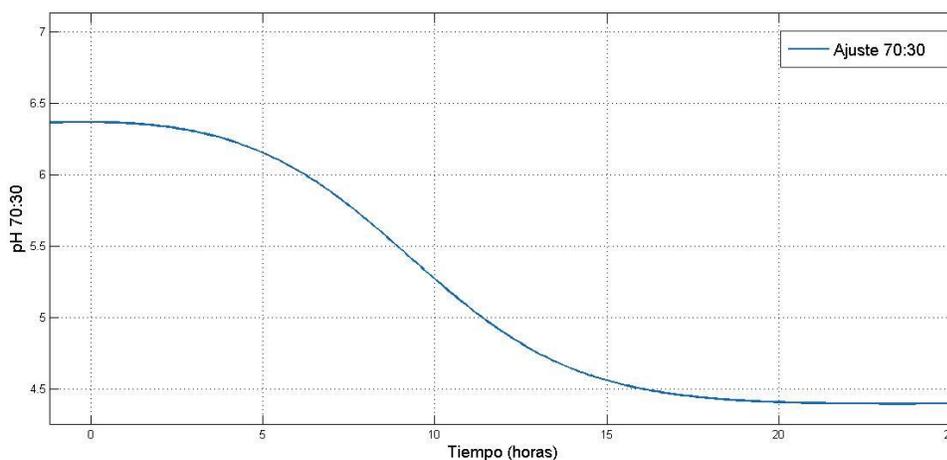


Figura 5. pH 70:30 Vs Tiempo



En las figuras 3,4 y 5 se puede observar que el pH más bajo se presenta transcurridas 20 horas para cada uno de los casos evaluados 4.446, 4.409 y 4.43 respectivamente obteniendo un menor pH en la muestra 50:50. Este tiempo de mayor reducción coincide con el tiempo de mayor reducción indicando que el pH inmediatamente anterior es un pH ideal para dicho medio, es decir en el paso de 18 a 20 horas con un pH de 4,4695, 4,474 y 4,4645 para las muestras 30:70, 50:50 y 70:30 respectivamente.

En las figuras 3,4 y 5 del descenso de pH se muestra que en el momento del ajuste se hizo uso la ecuación logística dos veces indicando que el microorganismo empleó dos fuentes de carbono lo que se conoce como crecimiento diauxico;

causado por un cambio en los patrones metabólicos en el medio creciente, una vez se agota un sustrato de carbono, la célula desvía sus energías de crecimiento para rediseñar el nuevo suministro de carbono (Flickinger, Drew, & Wiley, 1999).

Se estima que el microorganismo empleó primero el suero por contener lactosa, para luego emplear los diferentes azúcares disponibles, dicho orden por la naturaleza de los microorganismos empleados.

Con el fin de cuantificar la reducción de pH en cada uno de los medios estudiados e identificar cual de ellos presentó una mayor reducción y contrastar dichos resultados con la obtención de ácido láctico. Se realizó el análisis del porcentaje de reducción en el tiempo que se observó en las figuras 6, 7 y 8 para las combinaciones 30:70, 50:50 y 70:30 (Mora: suero), respectivamente.

Figura 6. Porcentaje de reducción de pH 30:70 Vs Tiempo

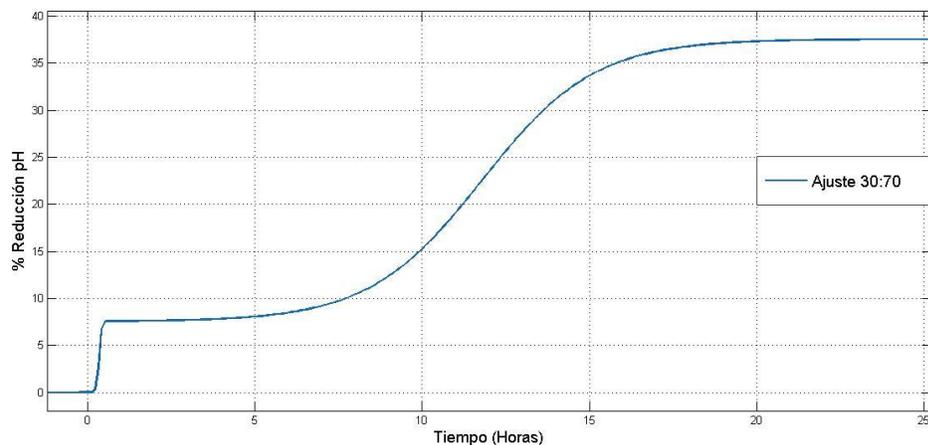


Figura 7. Porcentaje de reducción de pH 50:50 Vs Tiempo

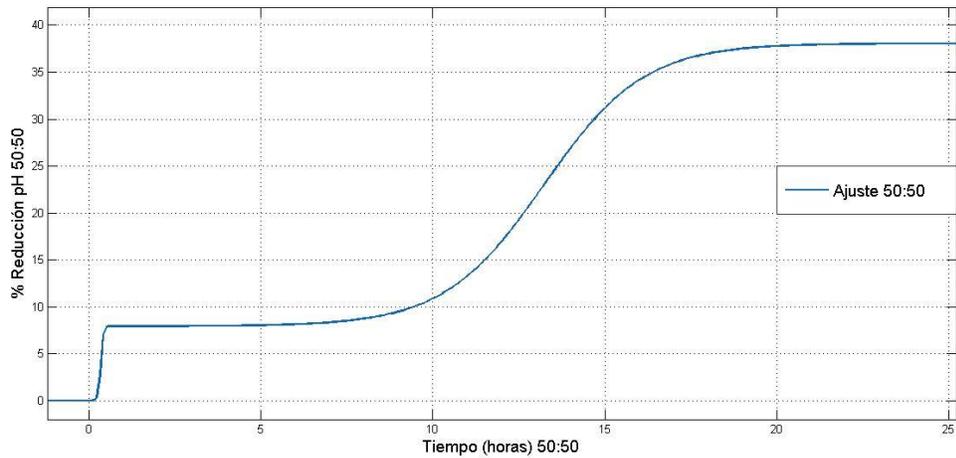
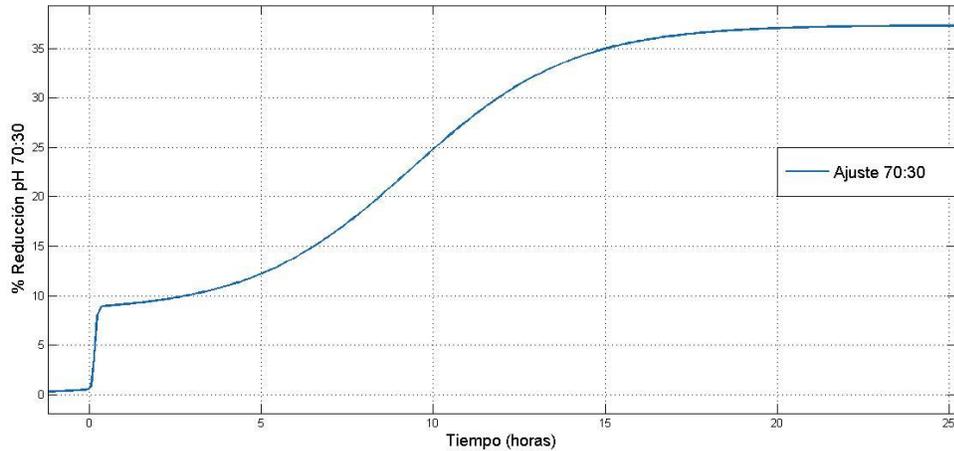


Figura 8. Porcentaje de reducción de pH 70:30 Vs Tiempo



De los ajustes obtenidos en las figuras 3,4 y 5, en la tabla 11 se muestran los coeficientes de la ecuación logística, para la reducción de pH en el tiempo y de los ajustes obtenidos en las figuras 6,7 y 8, en la tabla 12 se muestran los coeficientes de la ecuación logística, para los porcentajes (%) de reducción de pH en el tiempo.

Tabla 11. Coeficientes de la ecuación logística de la reducción de pH en el tiempo

| PARAMETROS | 30:70 | 50:50 | 70:30 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| a1 | 2.016 | 1.938 | 2.262 |
| a2 | 4.446 | 4.409 | 4.43 |
| b1 | 0.001657 | 3,92E-05 | 0.0263 |
| b2 | -0.1089 | -0.13 | 0.0635 |
| c1 | 0.5603 | 1.283 | 0.3947 |
| c2 | -1.075 | -0.6961 | -0.08384 |
| r ² | 0.996 | 0.9926 | 0.8279 |
| SSE | 0.02614 | 0.05415 | 2.055 |
| RMSE | 0.06111 | 0.08795 | 0.3379 |

Tabla 12. Coeficientes de la ecuación logística del porcentaje (%) de reducción de pH en el tiempo

| PARAMETROS | 30:70 | 50:50 | 70:30 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| a1 | 30.01 | 30.13 | 28.99 |
| a2 | 7.543 | 7.929 | 8.35 |
| b1 | 1,08E+03 | 9,05E+03 | 55.27 |
| b2 | 3,31E+07 | 3,31E+07 | 147.5 |
| c1 | -0.5924 | -0.6885 | -0.4283 |
| c2 | -29.09 | -29.09 | -29.09 |
| r ² | 0.9907 | 0.9734 | 0.9974 |
| SSE | 36.55 | 0.9734 | 3.025 |
| RMSE | 1.352 | 2.35 | 0.6574 |

Los coeficientes a2 equivalen a los valores máximos de pH a los que se puede llegar, teniendo en cuenta esto se puede deducir que el mayor porcentaje de reducción de pH lo alcanzó el medio 50:50 con un 30,13 % de reducción observado

en la tabla 10, llegando en descenso hasta un pH de 1,938 identificado en la tabla 9.

Los coeficientes indican el comportamiento cinético del microorganismo en las diferentes fuentes de carbono y energía, positivos y negativos se definen como facilitar e interferir interacciones, respectivamente, entre los individuos en la población. Coeficientes de interacción positivos aumentan la capacidad de carga y evita la reducción de la tasa de crecimiento aumentando el tamaño de la población. Por otra parte, coeficientes de interacción negativa disminuyen la capacidad de carga y promueven la reducción en la tasa de crecimiento a medida que aumenta el tamaño de la población. Teniendo en cuenta esto se puede identificar que los coeficientes varían entre positivos y negativos, atribuyendo dicha característica al crecimiento dióxido por la disposición de dos fuentes de carbono y energía y en la forma en la cual el microorganismo hace uso de ellos.

Teniendo en cuenta lo anterior y contrastando los resultados obtenidos en la cuantificación de ácido láctico, la ecuación logística analizada en los estudios de pH en el tiempo, explica el comportamiento interno del proceso de producción mediante los cambios en signos de coeficientes, generando claridad frente a los datos finales, es decir la interacción de los coeficientes, el mayor porcentaje de reducción de pH y el menor dato de pH registrado coinciden con la mayor producción de ácido láctico obtenida, correspondiente al medio 50:50 con un total de $884,442 \pm 0,089 \mu\text{g}$ ácido láctico/ L

CONCLUSIONES

Del proceso de caracterización de sustratos se extrae que la mora residual presenta un porcentaje de humedad aproximadamente del 84,64%, porcentaje de cenizas del 0,04%, una concentración de azúcares expresado en grados Brix de 6,6 y pH inicial de 2,947. El suero de leche sin proceso de desproteinización tiene un porcentaje aproximado de humedad del 94,04%, un porcentaje de cenizas inferior a 0,01% y una concentración de azúcares expresado en contenido de lactosa de 0,02878% y un pH inicial de 6,7.

La mora residual y el suero de leche son un sustrato potencial como fuente de carbono para el proceso de fermentación del *Lactobacillus sp* en la producción de ácido láctico, presentando porcentajes reducción de pH significativos con 30,13%, 30.01% y 29.08% de reducción en las combinaciones 50:50, 30:70 y 70:30 respectivamente, un indicador determinante en la actividad del microorganismo durante el tiempo de fermentación.

El método de cloruro férrico arrojó que la concentración máxima de ácido láctico, para todos los ensayos se obtiene transcurridas 20 horas de fermentación en concentraciones $461,068 \pm 0,118$; $884,442 \pm 0,089$ y $845,600 \pm 0,086$ μg ácido láctico/L en los ensayos 30:70, 50:50 y 70:30 (mora - suero), respectivamente.

Se estima que el pH de mayor producción es de 4,4 en 18 horas de proceso, alcanzando la mayor tasa de producción y reducción de pH a las 20 horas

En el análisis de la ecuación logística en cada una de las gráficas analizadas permitió observar que el medio presenta un crecimiento diauxico durante el proceso de fermentación ocasionado por las dos fuente de carbono y energía.

El mejor resultado se obtuvo en la mezcla 50:50 a las 20 horas del bioproceso con un total de $884,442 \mu\text{g}$ ácido láctico/L.

RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización de los sustratos en sus respectivas combinaciones, para la identificación del contenido del mismo y visualizar el aporte que en conjunto le generan al proceso.

Evaluar mezclas más estrechas de los sustratos para optimizar el contenido del mismo de acuerdo a los aportes de cada uno.

Evaluar otros microorganismos que puedan interactuar mejor con el suero de leche debido a que el empleado solo fue evaluado anteriormente en la mora residual.

Realizar suplementación de los medios con azúcares.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Agudelo Herrera, M. (2011). *ENSAYOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO L(+) LÁCTICO A PARTIR DE LA MORA DE CASTILLA *Rubus glaucus* Benth PROVENIENTE DEL ORIENTE ANTIOQUEÑO.*
- Analítica, I. J. D. E. A. (2008). I jornadas de actualización analítica. In *Calidad de suero: tendencias y metodologías analíticas que aplican en su control.*
- Ayala, L., & Valenzuela, C. (2013). Caracterización de la mora de castilla (*Rugus Glaucus* Blent) en seis estadios de maduración. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 11(2), 10–18.
- Barragán, B. E., Tellez, Y. A., & Laguna Trinidad, A. (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 44–50.
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J., & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001>
- Farinango, M. E. (2010). *ESTUDIO DE LA FISILOGIA POSTCOSECHA DE LA MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth) Y DE LA MORA VARIEDAD BRAZOS (*Rugus* sp.).*
- Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:M?todos+para+la+cuantificaci?n+de+prote?nas#1>
- Flickinger, M. C., Drew, S. W., & Wiley, J. (1999). *BIOPROCESS TECHNOLOGY: FERMENTATION, BIOCATALYSIS, AND BIOSEPARATION. Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation , Biocatalysis , and Bioseparation.*
- Iberfluid, & Rotronic. (2008). *MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA EI concepto actividad del agua (AW).*

- Idris, A., & Wahidin, S. (2006). *Effect of Na-alginate and bead diameter on lactic acid production from pineapple waste using immobilized Lactobacillus delbrueckii ATCC 9646*. *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 159). Elsevier Masson SAS. [http://doi.org/10.1016/S0167-2991\(06\)81619-8](http://doi.org/10.1016/S0167-2991(06)81619-8)
- Incontec/ instituto colombiano de normas tecnicas y certificación. (1997). NTC 4106 frutas frescas. mora de castilla. especificaciones.
- Jawad, A. H., Alkarkhi, A. F. M., Jason, O. C., Easa, A. M., & Nik Norulaini, N. a. (2013). Production of the lactic acid from mango peel waste - Factorial experiment. *Journal of King Saud University - Science*, 25(1), 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2012.04.001>
- Kosseva, P. S. P. J. F. K. C. J. K. M. (2010). Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1). Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132010000100027&script=sci_arttext
- M, C. G., & P, G. A. (2013). PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO DE LACTOSUERO SUPLEMENTADO UTILIZANDO *Lactobacillus casei*. *Biotecnología En El Sector Agropecuarios Y Agroindustrial*, 11(1), 136–143.
- Marrugo, L., & Baena, M. (2010). ENSAYOS PARA LA PRODUCCION BIOTECNOLOGICA DE ÁCIDO LACTICO EMPLEANDO PIÑA COMO SUSTRATO.
- Moreno, L., & Crespo, S. (2010). PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMO HERRAMIENTAS PARA ESTUDIOS EN FISIOLÓGÍA. *Laboratorio de Fisiología Y Bioquímica Vegetal.*, 187–248.
- Oviedo, J. C., Casas, A. E., Valencia, J. a, & Zapata, J. E. (2014). Análisis de la Medición de la Biomasa en Fermentación en Estado Sólido empleando el Modelo Logístico y Redes Neuronales. *Información Tecnológica*, 25(4), 141–152. <http://doi.org/10.4067/S0718-07642014000400016>
- Pacios, A., Cruz, Y., Bell, A., Carrera, E., & Michalena, G. (2009). Síntesis y caracterización del lactato ferroso para fortificación de alimentos infantiles. *Redalyc, XLIII*(1), 36 – 43.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>

- Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (2007). The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Research International*, 40(7), 808–818. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.012>
- Pozo, M., Díaz, F., Fernández, S., Marquina, A., Tellado, A., & Vila, A. (2010). Planta De Producción De Ácido Láctico, 1.
- Rios Castro, A. (2011). *caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas*.
- Schepers, A. W., Thibault, J., & Lacroix, C. (2006). Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 324–337. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.028>
- Serna Cock, L., & Rodríguez de Stouvenel, a. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 5, 54–65. <http://doi.org/10.1080/11358120509487672>
- Tango, M. S. a, & Ghaly, a. E. (1999). Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass and Bioenergy*, 16, 61–78. [http://doi.org/10.1016/S0961-9534\(98\)00062-2](http://doi.org/10.1016/S0961-9534(98)00062-2)
- Vanegas, M. C., Martínez, A. J., & González, L. M. (2011). Búsqueda de cepas nativas de *Lactobacillus* spp con potencial en bioconservación de alimentos. *Alimentos Hoy*, 15, 2–10.
- Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2014). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>
- Yepes, sandra milena, Montoya, lina johana, & Orozco, F. (2008). Valorización De Residuos Agroindustriales–Frutas–En Medellín Y El Sur Del Valle Del Aburrá, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 61(1), 4422–4431. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24742>
- SURIDERP. Chahal. (1995). Ullman's encyclopedia of industrial chemistry. De barbara Elvers. Ed 5. pp. 97-104.

ANEXO A

Metodo de Biuret para la determinación de proteínas

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu_2^+ y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Cu_2^+ se acompleja con 4 NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. (Fernández & Galván, 2006)

Se tomaN 0,5ml de la muestra en un tubo de ensayo, luego se adicionaron 0,5ml de Biuret (preparado previamente), se dejó reposar por 30 min y finalmente se realizó una lectura en un refractómetro a 540 nm.

Tabla B1. Datos para la obtención de la curva patrón para la cuantificación de proteína del método de Biuret. Fuente: Autor

| Longitud de Onda | Concentración | Absorbancia |
|------------------|---------------|-------------|
| 540 | 0 | 0,152 |
| 540 | 4 | 0,173 |
| 540 | 8 | 0,223 |
| 540 | 16 | 0,301 |
| 540 | 20 | 0,352 |

ANEXO B

Método de cloruro férrico para la determinación de ácido láctico

Para la cuantificación de ácido láctico en el trabajo se utilizó el siguiente método colorimétrico: se toman 10 mL de muestra a la que se le adicionan 5 mL e solución de FeCl₃ y se completa a 50 mL con agua destilada. Se prepara un blanco con agua para calibrar el equipo y se lee la Absorbancia de la muestra a $\lambda=440$ nm.

El cloruro férrico (FeCl₃) se prepara pesando 0,5 g de FeCl₃, adicionando 1 mL de HCl 0,1 N y completando a 50 mL con agua destilada. La lectura debe ser inmediata debido a que este reactivo se descompone rápidamente con la luz. (Pacios, Cruz, Bell, Carrera, & Michalena, 2009)

Tabla B1. Datos para la obtención de la curva patrón de ácido láctico

Fuente: Autor

| Longitud de Onda | Concentración | Absorbancia |
|------------------|---------------|-------------|
| 440 | 20 | 0,58 |
| 440 | 40 | 0,57 |
| 440 | 60 | 0,61 |
| 440 | 80 | 0,64 |
| 440 | 100 | 0,66 |
| 440 | 120 | 0,68 |
| 440 | 140 | 0,67 |