



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL LACTOSUERO POR  
MEDIO DE FERMENTACIÓN USANDO *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*,  
*LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS* Y *LACTOBACILLUS  
DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS***

Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniera Biotecnóloga

**AUTORA: ALISON DAYANA ALVAREZ HERRERA**

**TUTOR: ING. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, PhD.**

Cuenca- Ecuador

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, Alison Dayana Alvarez Herrera con documento de identificación N° 0302886478,  
manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la  
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total  
o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 27 de febrero del 2024

Atentamente,



---

Alison Dayana Alvarez Herrera

0302886478

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Alison Dayana Alvarez Herrera con documento de identificación N° 0302886478, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Obtención de ácido láctico a partir del lactosuero por medio de fermentación usando *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*”, el cual se ha desarrollado para obtener el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 27 de febrero del 2024

Atentamente,



---

Alison Dayana Alvarez Herrera

0302886478

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jorge Braulio Amaya Pinos con documento de identificación N° 0103444923, docente de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL LACTOSUERO POR MEDIO DE FERMENTACIÓN USANDO *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*, *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS* Y *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS*, realizado por Alison Dayana Alvarez Herrera con documento de identificación N° 0302886478, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 27 de febrero del 2024

Atentamente,



---

Ing. Jorge Braulio Amaya Pinos, PhD

0103444923

## DEDICATORIA

A Dios, a mis padres Pablo y Teresa por acompañarme en cada paso que doy en la búsqueda de ser mejor persona y profesional, a mi hermana Gheimmy por su apoyo, compañía, risas, a mis abuelitos que están presentes conmigo siempre apoyándome, por sus oraciones y bendiciones, por sus consejos y enseñanzas, a mi abuelito Luis un abrazo y beso hasta el cielo.

A Sofía, por su amor y apoyo incondicional, por ser uno de los motivos principales para seguir y no darme por vencida.

A todos mis tíos, tías y primos por su apoyo, por sus consejos.

A mi hermana mayor, Anabel por tus consejos y siempre estar pendiente, por las risas y anécdotas juntas.

A mi Toño Papito, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia, por celebrar cada logro conmigo, hoy por fin lo logramos.

A mis amigas que hice desde el principio y aun siguen conmigo, y a los amigos que conocí en el transcurso y se volvieron importantes.

A mis profesores, gracias por guiarme y forjar la persona que soy, a la Doctora Inés Malo, por ser un pilar fundamental y gran amiga en todo este proceso, a mi director de tesis Ing. Jorge Amaya.

A mis fieles compañeros Kiru, Sabi, Oreo y Milo, por acompañarme hasta las madrugadas.

A D. Alejandro, llegaste tarde, pero espero te quedes siempre, gracias por apoyarme y por todos los días demostrarme lo que es un amor bonito.

## AGRADECIMIENTO

En un inicio jamás creí estar aquí, acabando con una etapa que me abre el camino de una completamente nueva, en todo este lapso de tiempo gané y perdí, perdí sueños, perdí mi balance, pero yo sé que tal vez me encontré más de lo que perdí, gane vida, experiencias y gane muchas historias, las cuales contaré y recordaré por siempre, pero también entendí, que quizás estuvo bien equivocarme tantas veces, por que hoy agradezco ser la persona en la que me convertí, agradezco a esa niña que jugaba con su birrete y título, la intensa que jamás se quedaba callada, por que hoy puedo afirmar que está hecha de cambios y muchos sueños, sin duda agradezco a los medios que me hicieron llegar aquí, a las personas, a mi inquietud y al amor, sin alguna de ellas esto no sería posible, a los amores y apoyos incondicionales, que estuvieron en todo este proceso, a su vez, a los apoyos que no esperaba, pero se quedaron, a los encuentros, al HOMBRE maravilloso del que cada día estoy más enamorada, a los momentos con amigos, las noches sin dormir, a los momentos, a las historias. Gracias a mis PADRES, esto es suyo, soy quien soy gracias a ustedes y a su apoyo, y no me refiero al título que desde hoy portare, soy la mujer que enseñaron a jamás darse por vencida, a poner a Dios siempre en mis decisiones y agradecer, a conseguir todo lo que me proponga, por que sé que siempre estarán conmigo apoyándome, sintiéndose orgullosos de mí, quiero seguir celebrando cada uno de los logros que están por venir. A mi HERMANA por el apoyo, las risas, los momentos juntas, eres la razón más importante que tengo. A mis ABUELITOS por sus oraciones, por su amor, su apoyo, por siempre preguntar y estar pendientes. A MI MEJOR AMIGA, empezamos esto juntas y terminamos juntas, aunque en lugares y carreras diferentes, gracias por siempre estar. A mis TÍOS/AS gracias por su apoyo, los consejos, a mi HERMANA MAYOR, gracias por siempre estar pendiente de mí, a pesar de la distancia, por tu cariño. A mis AMIGOS que conocí a lo largo de la carrera, espero me duren toda la vida, gracias por hacer mis días más bonitos, por las risas, por los momentos, GRACIAS FAMILIA Y AMIGOS ¡LO LOGRAMOS!.

**Allyzon**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
CAPÍTULO 1 .....	3
1.1 INTRODUCCIÓN .....	3
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.3 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA .....	6
1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	6
1.5 JUSTIFICACIÓN .....	6
1.6 OBJETIVOS .....	8
1.6.1 GENERAL .....	¡Error! Marcador no definido.
1.6.2 ESPECÍFICOS .....	9
1.7 HIPÓTESIS.....	9
CAPÍTULO 2 .....	10
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	10
2.1 ANTECEDENTES.....	10
2.2 MARCO TEÓRICO .....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1 INDUSTRIA LÁCTEA EN EL ECUADOR .....	12
2.2.2. LACTOSUERO.....	13
2.2.3. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO .....	14
2.2.3.1 REQUISITOS FÍSICO QUÍMICOS DEL LACTOSUERO.....	15
2.2.4. TIPOS DE LACTOSUERO .....	16
2.2.5. EFECTOS QUE CAUSA EL LACTOSUERO AL MEDIO AMBIENTE .....	16
2.2.6. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA .....	17

2.2.7. OTRAS ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO .....	18
2.2.8. USOS DEL LACTOSUERO .....	20
2.2.9. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	20
2.2.9.1 RUTAS DE FERMENTACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	22
2.2.9.2 STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS .....	23
2.2.9.3. LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS .....	24
2.2.9.4. LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS.....	26
2.3. ÁCIDO LÁCTICO .....	27
2.3.1 ESTRUCTURA DEL ÁCIDO LÁCTICO .....	27
2.3.2 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	28
<b>2.3.2.1 SEPARACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR DESTILACIÓN REACTIVA.....</b>	<b>28</b>
2.3.2.2 FILTRACIÓN CON MEMBRANAS .....	29
2.3.2.3 FERMENTACIÓN CON LACTOSUERO.....	29
2.3.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO .....	29
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN .....	33
3.1.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	34
3.1.2.1. MEDIO DE CULTIVO .....	36
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	37
3.3 VARIABLES .....	38
3.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE .....	38
3.4. RECOGIDA DE DATOS .....	38
3.5. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	39
3.5.1.1. MEDICIÓN DE pH.....	39



3.5.1.2. MEDICIÓN DE LA ACIDEZ .....	40
3.5.1.3. DESPROTONACIÓN DEL LACTOSUERO .....	41
3.5.2. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.....	43
3.5.2.1. PREPARACIÓN DEL CALDO NUTRITIVO .....	44
3.5.2.2. PREPARACIÓN DEL LACTOSUERO COMO MEDIO DE CULTIVO.....	44
3.5.3. INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	44
3.5.3.1. INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LACTOSUERO	46
3.5.4 FERMENTACIÓN.....	46
3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	48
3.7 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO .....	49
3.7.1 FILTRADO AL VACÍO .....	50
3.7.2. DESTILACIÓN SIMPLE .....	50
3.7.3. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ÁCIDO LÁCTICO .....	51
3.7.3.2. DETERMINACIÓN DEL pH.....	52
3.7.3.3. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES CARACTERÍSTICOS DEL ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT-IR .....	52
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
4.1.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS .....	54
4.1.2 MEDICIÓN DEL pH DE LOS LACTOSUEROS .....	54
4.1.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	56
4.1.4. MEDICIÓN DE ACIDEZ .....	57
4.1.5. RESULTADOS PROMEDIO DE MEDICIÓN DE pH FINAL DE ÁCIDO LÁCTICO	60
4.1.6. VERIFICACIÓN DE LOS GRUPOS FUNCIONALES MEDIANTE FT-IR .....	63
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>86</b>

5.1 CONCLUSIONES.....	86
5.2 RECOMENDACIONES .....	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
ANEXOS.....	80

## RESUMEN

El presente trabajo de titulación, tiene como propósito desarrollar una metodología para la obtención de ácido láctico mediante vía fermentativa mediante el suero lácteo residual proveniente del proceso de la elaboración de queso de la empresa Nutri Leche del Cantón Cañar y de la parroquia Zhoray, localizada en el cantón Azogues, utilizando una mezcla de bacterias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*), se estimó la producción de ácido láctico en cada sustrato, expresada en % de acidez y pH. Se analizaron los factores de tratamiento, los mismos que incluyeron el tiempo de fermentación con diferentes niveles de 72 y 96 horas, cuyo proceso incluyó un pretratamiento del sustrato, el mismo que tuvo una suplementación con fosfato de amonio y extracto de levadura. La fermentación se ejecutó a dos temperatura de 42 °C durante 72 horas. De la misma manera se trabajó con dos medios de cultivo para la inoculación de las bacterias los cuales fueron el Caldo Nutritivo de la empresa <sup>TM</sup> MEDIA, TITAN BIOTECH LTD., y el Lactosuero, con la finalidad de evaluar la mejor ruta de fermentación, la caracterización de ácido láctico obtenido fue realizada mediante la medición de la acidez titulable según el método de prueba NTE INEN 13. Se identificaron los grupos funcionales del ácido láctico obtenido mediante FT-IR. Con base a los resultados obtenidos en este experimento, se concluye que los factores tratamiento analizados inciden en la concentración de ácido láctico, concluyendo así que las condiciones recomendadas del proceso para la obtención son: Las bacterias sembradas en el medio de lactosuero enriquecidas con extracto de levadura y  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , tuvieron una mayor propagación de bacterias, presentando un valor promedio de acidez titulable de  $6\pm$  %, a comparación de los métodos que fueron sembrados en caldo nutritivo.

**PALABRAS CLAVE:** ÁCIDO LÁCTICO/ EXTRACTO DE LEVADURA/ FOSFATO DE AMONIO/ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*/ *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS* / *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS*.

## ABSTRACT

The purpose of this thesis work is to develop a method for the production of lactic acid through fermentative means using the whey waste from cheese manufacturing by Nutri Leche Company located in the Canton Cañar and Parish Zhoray within the Canton Azogues, utilizing a mixture of lactic acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*). The production of lactic acid was estimated in each substrate expressed as percent acidity and pH. Factor treatments were analyzed, including fermentation time with different levels of 72 and 96 hours, which involved substrate pretreatment supplemented with ammonium phosphate and yeast extract. Fermentation took place at two temperatures of 42°C during 72 hours. Additionally, two culture mediums were used for bacterial inoculation, namely Nutrient Broth from the company™ MEDIA, TITAN BIOTECH LTD., and Whey, aiming to evaluate the best route of fermentation. Acetic acid characterization obtained was performed via measuring titratable acidity according to the test method NTE INEN 13. Functional groups of the produced lactic acid were identified using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Based on the results obtained in this experiment, it can be concluded that factor treatment influences lactic acid concentration, thus recommending the following process conditions for obtaining lactic acid: The selected bacteria grown in whey enriched with yeast extract and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  showed higher bacterial growth, presenting an average titratable acidity of 6±%, compared to methods seeded in nutrient broth.

**KEYWORDS:** LACTIC ACID/ YEAST EXTRACT/ AMMONIUM PHOSPHATE/  
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS/ LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS/  
LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS

# CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento altamente nutritivo que contiene vitaminas (A, B12, D) y minerales (fósforo, potasio, calcio, magnesio, selenio, yodo, zinc) y es esencial para la nutrición humana. La elaboración de leche y sus subproductos (queso, yogurt, mantequilla, entre otros) es la actividad básica del sector lácteo, el cual representa aproximadamente el 4% del producto interior bruto (PIB) agroalimentario del país está relacionado con la industria láctea. Esta situación tiene un efecto económico notable y una gran capacidad de exportación. Según datos del Servicio de Impuestos Internos, el sector lácteo experimentó un crecimiento del 10,92% en septiembre de 2021 en comparación con el mismo mes del año anterior. (*La Producción De Leche En Ecuador, 2022*)

De acuerdo con el MAGAP, en Ecuador, la industria láctea produce en promedio 5,3 millones de litros de leche diariamente, mientras que la industria quesera genera 1,2 millones de litros de suero al día. Por cada 100 litros de leche utilizados en la elaboración de queso, se generan 90 litros de residuos de lactosuero, lo que la sitúa como una de las industrias más contaminantes para las fuentes de agua (*Industria Láctea En Ecuador MAGAP, 2019*).

La cadena productiva de la leche en Ecuador involucra alrededor de 300.000 unidades productivas agropecuarias, que emplea a 1.200.000 personas a lo largo de su cadena productiva. (Barrera Rodríguez, 2021). La región Sierra es la mayor productora de leche en el país, seguida de la Costa y la Amazonia. (Medrano, 2023). La industria láctea ecuatoriana cumple altos estándares de calidad e inocuidad, y las empresas lácteas formales realizan inversiones

significativas en tecnología, capacitación y certificación para garantizar la calidad de sus productos. (Medrano, 2023).

La finalidad de este trabajo radica en el aprovechamiento de este desecho que es el suero de leche, hoy en día este desecho es depositado a plantas de tratamiento de agua el mismo que se produce en grandes cantidades en las industrias antes mencionadas, con el fin de obtener un producto con diversas aplicaciones cosméticas, alimentarias y farmacéuticas como es el ácido láctico.

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La biotecnología es un campo en expansión que involucra el uso de seres vivos y sus características para obtener, crear y modificar diversos productos, incluyendo alimentos y cosméticos (Ortega, 2020). Emplea una serie de métodos basados en sistemas y componentes biológicos para la producción, lo que impulsa constantemente el progreso en distintas industrias (García, 2010). En la industria láctea, la biotecnología desempeña una función esencial en la mejora de la producción, calidad y diversidad de los productos lácteos, mientras contribuye a la sostenibilidad y eficacia de los procesos.

En la industria láctea se desperdicia una cantidad significativa de suero, el cual contiene proteínas y azúcares de gran valor. Descartar este producto no solo contribuye a la contaminación ambiental, sino que también genera pérdidas económicas. El suero puede ser utilizado en la producción de ácido láctico, lo que ofrece una amplia variedad de aplicaciones. Sin embargo, las pequeñas industrias lácteas no pueden aprovechar estas ventajas debido a la falta de tecnologías necesarias, las cuales tienen costos elevados (Parikh, 2016). Como

consecuencia, la producción de suero de leche ha empeorado, y su vertido en la tierra pone en peligro la estructura física y química del suelo. Esto, a su vez, reduce el rendimiento de los cultivos y altera la contaminación de las aguas subterráneas.

Según (Salazar & Alisson Andrea, 2022), la falta de concienciación sobre los beneficios del aprovechamiento del suero obtenido tras procesos tecnológicos de la materia prima ha provocado un desaprovechamiento de este alimento. Actualmente, aún existen pocos procesos centrados en la utilización del suero en la producción de bebidas, alimentos y complementos proteicos. A pesar de eso se siguen liberando grandes volúmenes de lactosuero, que perjudican el medio ambiente, donde se desechan sin ningún propósito. Solo en el año 2019, se produjeron 34,835 litros de lactosuero, según los datos recopilados de los principales productores de queso del país. La discusión sobre si este producto lácteo es beneficioso o no para la salud de las personas y animales ha impedido el avance en el uso adecuado de este recurso.

La producción de ácido láctico a partir de suero de leche y bacterias lácticas tiene una relevancia práctica significativa. El ácido láctico es un compuesto ampliamente utilizado en la industria de alimentos como acidulante, conservante y potenciador del sabor. Además, el suero de leche es un subproducto de la industria láctea que representa un desafío en términos de su gestión y aprovechamiento. (Miguel Mazorra, 2020).

Por lo tanto, el presente trabajo de titulación busca mejorar un proceso eficiente para la producción de ácido láctico a partir de este subproducto contribuirá a la valorización de los residuos lácteos y a la obtención de un producto de alto valor agregado. La producción de ácido láctico a partir del lactosuero y bacterias lácticas es una línea de investigación en constante desarrollo en el campo de la biotecnología.

El uso del lactosuero de suero de leche como base para la producción de ácido láctico es una alternativa sostenible y económicamente viable. Además, las bacterias lácticas utilizadas en este proceso son microorganismos probióticos que tienen beneficios para la salud humana. Por lo tanto, esta investigación no solo tiene un impacto industrial y científico, sino también social y ambiental.

### **1.3 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

La siguiente investigación se ejecutó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Ecuador, misma que tuvo una duración de aproximadamente dos meses. Este estudio se ha centrado en la recolección de lactosuero de la empresa Nutri Leche del cantón Cañar, y de la parroquia Zhoray. En este apartado es importante denotar que el estudio tiene como sustrato el lactosuero obtenido de la elaboración de queso fresco y quesillo.

### **1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿ En un proceso fermentativo con las cepas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* el lactosuero es un sustrato ideal para la obtención de ácido láctico?

### **1.5 JUSTIFICACIÓN**

El lactosuero es un efluente orgánico, enemigo fuerte del medio ambiente si no se utiliza adecuadamente. Debido a que se desconocen las prácticas sostenibles del suero de la leche, se



lo considera como principal contaminante ambiental de la industria láctea, ya que diariamente se descarga grandes cantidades de suero de leche en los pastos, así como también en las vertientes de agua, disminuyendo la presencia de oxígeno en el agua y muerte de la vida acuática, así como también la de insectos y otros animales. (Robalino, 2017).

Se denomina lacto suero o suero de leche a aquella sustancia líquida que se obtiene como resultado de la separación del coágulo de la leche al momento de elaborar queso, posterior a la precipitación de la caseína. (Sonia Soriano, 2011). Se describe como un líquido claro, de tonos verde amarillento, con aspecto turbio.

A pesar de ello, el alto contenido de lactosa que posee este producto lo hace inapropiado tanto para el consumo humano como para suelos y ríos. Actualmente, este subproducto es llevado a plantas de tratamiento de agua, en los que se someten a procesos en donde la parte sólida es empleada como compostaje y la parte líquida se utiliza como fertilizantes, se utiliza también como alimento para porcinos. (Dosuky, 2022). En países más desarrollados, este subproducto es utilizado para la elaboración de suero en polvo hidrolizado y proteínas comestibles que generalmente son utilizadas por deportistas. No obstante, también puede utilizarse para la obtención de ácido láctico, el mismo que presenta una variedad de beneficios y aplicaciones en industrias farmacéuticas, cosméticas, químicas y alimentarias.

El tipo y la composición química del suero de leche varía de diferentes factores, los mismos que pueden ser, el tipo de leche utilizada, el tipo de queso y el proceso empleado. Dependiendo de estas características se puede clasificar el suero de leche en dos tipos más comunes como son el dulce y el ácido. (Valdés Rayo et al., 2018).

El suero contiene más de la mitad de los sólidos presentes, así como aproximadamente un 20% de proteínas como la lactoalbúmina y las lactoglobulinas, una cantidad significativa de lactosa y minerales como el calcio, el fósforo, el sodio y el magnesio. También incluye vitaminas hidrosolubles como tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, niacina, cobalamina y ácido ascórbico. (Valdés Rayo et al., 2018).

Este trabajo está enfocado a la obtención de ácido láctico mediante vía fermentativa, aprovechando el desecho agro láctico producido por dos industrias lácteas del Ecuador como son Zhoray y Cañar. La finalidad como tal esta enfocada en el aprovechamiento del lactosuero, residuo producido en grandes cantidades en las industrias lácteas, con el fin de obtener un producto con varias aplicaciones tales como: cosméticas, alimenticias y farmacéuticas con un gran valor agregado como es el caso del ácido láctico comparando diferentes parámetros.

Es importante el desarrollo de nuevas tecnologías y/o aplicaciones las cuales ayuden a reducir el impacto ambiental que se ha causado hasta ahora, es decir, aprovechar procesos efectivos y con un impacto positivo a la economía del país. Una de las formas en las que se puede tomar acción es aprovechar los residuos de las industrias lácteas, las cuales afectan gravemente al planeta.

## **1.6 OBJETIVOS**

### **1.6.1 GENERAL**

Obtener ácido láctico a partir del Lactosuero mediante vía fermentativa usando *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

### 1.6.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar los parámetros fisicoquímicos del lactosuero provenientes de las industrias lácteas mediante pruebas de laboratorio, comprobando las mejores condiciones de fermentación.
2. Obtener ácido láctico mediante vía fermentativa de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* para análisis cualitativo del ácido láctico obtenido mediante FT-IR verificando sus grupos funcionales.
3. Verificar mediante análisis estadísticos el proceso más efectivo para la obtención de ácido láctico.

### 1.7 HIPÓTESIS

¿El proceso fermentativo si influye en la obtención de ácido láctico utilizando las cepas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*?

## CAPÍTULO 2

### FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 2.1 ANTECEDENTES

La fabricación de ácido láctico a partir de la fermentación del lactosuero representa una estrategia viable para gestionar este subproducto contaminante de la industria de lácteos. Investigaciones indican que es posible extraer ácido láctico de este desecho, pero es esencial implementar un sistema de control de proceso efectivo. Este control se realiza en dispositivos conocidos como biorreactores, los cuales son desarrollados a través de investigaciones exhaustivas que guían su diseño, construcción y funcionamiento óptimo, con el objetivo de maximizar la eficiencia del proceso de producción. (UTPL, 2021)

Según (Gálvez Cadena, 2022), el interés por la preservación del medio ambiente ha llevado a promover la utilización de residuos agroindustriales como materia prima en las industrias mediante procesos de biotransformación. Esto pone de relieve la importancia de producir ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus casei*. En su experimento, se identificó el lactosuero como sustrato adecuado para la obtención de ácido láctico cuando se enriqueció con extracto de levadura, sulfato de amonio y peptona, y se inoculó con *Lactobacillus casei*, mientras se evaluaban diferentes temperaturas de fermentación: 29, 37 y 45°C. Analizando los parámetros cinéticos de la fermentación mediante cálculos de equilibrio de biomasa, se observaron datos sobre la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), el tiempo de duplicación (td), la duración de la fermentación por lotes (t) y la eficiencia de conversión de sustrato en producto ( $Y_p/s$ ), siendo el tratamiento a 45°C (T3) el que mostró el mejor rendimiento, con un 46,80%.

(Ortega, 2020) analizó "La deposición directa del lactosuero en cuerpos de agua, sin tratamiento previo causa problemas al medio ambiente de contaminación. El lactosuero contiene materia orgánica, debido a la materia orgánica incluyendo un 4,8% de lactosa, 0,75% de proteínas y 6,2% de materia seca los cuales son nutrientes valiosos que pueden ser utilizados como alimento y medio de cultivo para fermentaciones industriales".

(Lema Guamán, 2023), en su trabajo de titulado: "Aprovechamiento del suero de leche para la obtención de ácido láctico" implica la producción de ácido láctico a partir del suero de leche mediante la homofermentación empleando *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en condiciones anaeróbicas. En estas condiciones, las bacterias lácticas optimizan su metabolismo gracias a los aminoácidos esenciales presentes en el suero de leche, transformándola en lactosa y en ácido láctico. Al caracterizar el ácido láctico obtenido, se observó que el suero de leche inoculado con *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, suplementados con extracto de levadura y carbonato cálcico a una concentración de 0,5% y una temperatura de fermentación de 43 °C, mostró una mejor concentración de 23,29 g/L de ácido láctico y un pH significativamente más bajo de 3,09, que son propiedades físico-químicas del ácido láctico.

La temperatura juega un factor importante mismo que influye en la actividad de las enzimas de las células metabólicas. Las enzimas son más activas a temperaturas óptimas y la reacción enzimática se desarrolla al máximo. Sin embargo, por debajo y por encima del valor óptimo la velocidad de reacción de temperatura disminuye, lo que causa problemas en el metabolismo celular. (Patel, 2016).

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 INDUSTRIA LÁCTEA EN EL ECUADOR**

La industria láctea en Ecuador ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. El país tiene un gran número de productores lácteos, siendo la mayoría pequeños agricultores. Sin embargo, también existen empresas medianas y grandes involucradas en la producción de lácteos. (Muñoz et al., 2020). La cantidad de leche producida diariamente en el Ecuador es significativa, alcanzando los 6,25 millones de litros. A pesar de esto, la industria enfrenta desafíos como altos costos de producción, sobreproducción y falta de demanda suficiente de la leche producida. (Agualongo et al., 2019).

La pandemia de Covid-19 también ha tenido un impacto negativo en la industria, afectando actividades como el ordeño, el manejo de animales y el suministro de medicamentos e insumos agrícolas. (Guevara Viera et al., 2022). Además, se han identificado problemas ambientales relacionados con la gestión de residuos en las empresas procesadoras de lácteos. (Rodríguez-Guerra & Martínez, 2020). En general, existe la necesidad de mejorar las prácticas de gestión y el desarrollo sostenible en la industria láctea en Ecuador.

La industria láctea en Ecuador es una actividad importante en la agricultura y ganadería del país, representando el 6,1% de la actividad en general. Según un estudio, alrededor del 43,4% de la producción de leche fresca sin elaborar se destina al consumo final, mientras que el 56% restante se utiliza para la elaboración de productos lácteos, siendo estos el 89% del total consumido. (Mayorga, 2022)

Existen empresas lácteas en varias regiones del país, y se han implementado sistemas de gestión de prevención de riesgos laborales en algunas de ellas. (Cevallos et al., 2016). Además, se ha investigado sobre el aprovechamiento del lactosuero en la industria, ya que aproximadamente el 90% de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero, pero este subproducto se ha convertido en materia prima para la elaboración de varios productos alimenticios por su alto contenido nutricional. (Di Palma & Terán, 2023). También se ha desarrollado un laboratorio de investigación, desarrollo e innovación para la industria láctea en la zona 1 del Ecuador, con el objetivo de desarrollar nuevos proyectos innovadores. (López, 2019)

### **2.2.2. LACTOSUERO**

(Paiva Anciens Ramos et al., 2021) Lo define como un subproducto formado durante el proceso de coagulación de la leche en la fabricación de queso, caseína o productos lácteos similares. Es un residuo líquido que contiene agua, lactosa, proteínas y minerales. El suero tiene una alta calidad nutricional y puede utilizarse como insumo en las industrias alimentaria y de bioprocesamiento para la producción de productos lácteos, etanol, biogás y otros productos. Sin embargo, el volumen excesivo de suero generado en los procesos de fabricación de lácteos y su rápida desaparición plantean desafíos en su utilización, lo que lleva a usos menos útiles, como la suplementación de alimentos para animales o su eliminación como residuo. Por lo tanto, existe la necesidad de valorizar el suero e invertir en investigación y tecnología para expandir las actividades de la industria láctea mundial.

El suero es un subproducto proteico de bajo costo que ofrece varias propiedades en una amplia variedad de alimentos. Mejora la textura, el sabor y el color, emulsiona y estabiliza y exhibe muchas otras propiedades alimentarias. El suero tiene diversas aplicaciones comerciales, incluida la producción de etanol, ácidos orgánicos, bebidas carbonatadas, concentrados de proteínas, películas comestibles y enzimas. (Aucatoma & Sagnay, 2022).

Este producto se da tras la separación de la grasa láctea y la caseína de la leche entera. Es un subproducto de las industrias lácteas y se descarta en el ecosistema, provocando problemas ambientales. Existe la necesidad de convertir los nutrientes del suero en productos alimenticios y compuestos químicos valiosos. El suero también se puede utilizar en los campos de la salud, productos farmacéuticos, alimentos, plásticos y combustibles (Srinath, 2017) .

### **2.2.3. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO**

El suero es un subproducto de la industria láctea y tiene una composición que incluye agua, lactosa, proteínas y minerales. Es rico en calidad nutricional y tiene potencial para su uso en las industrias alimentaria y de bioprocesamiento.



**Tabla 1. Composición del suero de leche**

Parámetro	Valor %
Agua	93,2
Lactosa	4,85
Proteínas solubles	0,80
Grasa	0,50
Vitaminas y minerales	0,60
Ácido Láctico	0,05
Sólidos totales	0,6
Calcio	0,4

Fuente: (Calvopiña &amp;

Betancourt, 2020)

**2.2.3.1 REQUISITOS****FÍSICO****QUÍMICOS DEL LACTOSUERO**

Según los parámetros establecidos por la Norma NTE INEN 2594 para el lactosuero, se aprecia en la **Tabla 2**:

**Tabla 2. Requisitos físico químicos del Lactosuero**

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Lactosa % (m/m)					
Proteína láctea % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Grasa láctea % (m/m)	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Ceniza % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12

Acidez titulable % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 14
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	NTE INEN 13

**Fuente.** (INEN 2594, 2011)

#### 2.2.4. TIPOS DE LACTOSUERO

Existen varios tipos de lactosuero, siendo los más comunes el ácido, dulce y dulce acidificado. El suero de leche dulce se obtiene como subproducto de la producción de queso de pasta prensada, mientras que el lactosuero ácido se obtiene durante la fabricación de quesos de pasta hilada. Por otro lado, el lactosuero dulce acidificado se produce mediante la coagulación de la caseína con ácido láctico o ácido cítrico. Cada tipo de lactosuero tiene diferentes aplicaciones en la industria alimentaria y en la producción de suplementos proteicos. (Gálvez Cadena, 2022).

**Tabla 3.** Clasificación del lactosuero según su acidez

Tipo de Lactosuero	Acidez (%)
Ácido	3 - 5
Dulce	0 - 1

**Fuente.** (Gonzáles et al., 2017)

#### 2.2.5. EFECTOS QUE CAUSA EL LACTOSUERO AL MEDIO AMBIENTE

En la producción de la industria láctea se producen grandes cantidades de residuos líquidos, entre ellos la leche diluida, y separada, nata, así también como suero que contienen

grasas, proteínas, sólidos en suspensión y nitrógeno, mismo que al ser vertidos sin ser previamente tratados causen alta contaminación con el medio ambiente. (Torres, 2021)

Los lavados que se utilizan para limpiar los equipos y utensilios de la industria láctea contienen residuos alcalinos y químicos que se emplean para eliminar la leche y los productos lácteos, así como materiales caramelizados que se encuentran en tanques, mantequeras, latas, cubas, tuberías, bombas, salidas calientes y suelos (Torres, 2021). La eliminación de residuos lácteos, lactosuero (constituido por el 50% de los nutrientes del producto original) y salmueras aumenta significativamente la contaminación vertida.

#### **2.2.6. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA**

La finalidad del manejo del sobrante agua es eliminar los contaminantes que dañan el medio acuático y los organismos vivos en general, antes de arribar a la superficie terrestre, los ríos, los lagos y, en última instancia, los mares. El tratamiento implica una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos, que se clasifican en pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario. (Ceo, 2023)

El procesamiento inicial incluye la separación de materiales sólidos pesados que podrían ocasionar atascos, seguido por el tratamiento primario que permite extraer partículas suspendidas que no fueron retiradas durante el paso anterior. Posteriormente, en el tratamiento secundario biológico, se emplean microorganismos para eliminar sustancias orgánicas disueltas. Finalmente, en el tratamiento terciario, se agregan agentes químicos para realizar el desinfectado. (SPENA GROUP, 2018).

El tratamiento biológico es el principal método utilizado en la industria láctea debido a la biodegradabilidad de las aguas residuales. Las aguas residuales de la industria láctea contienen una alta concentración de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, y su pH puede variar debido a la fermentación de lactosa a ácido láctico. (Fabregas, 2024)

El elevado potencial contaminante del lactosuero, con una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) que oscila entre 30.000 y 50.000 mg/l, junto con el porcentaje de ácido láctico presente en él, perturba considerablemente los procesos biológicos que ocurren en las instalaciones de tratamiento, lo que conlleva un aumento de los costes. Para el tratamiento del lactosuero, se aplican preferentemente tratamientos biológicos antes de verterlo al suelo y a los ríos, por lo que se proponen procesos convencionales y no convencionales. (Flowen, 2022).

Los procesos no convencionales separan primero las corrientes residuales sin mezclarlas con las corrientes indeseables, con el objetivo de utilizar los residuos industriales para obtener diversos productos de fermentación. El uso de levaduras y bacterias lácticas es habitual en estos procesos de producción, con la ventaja de reducir la cantidad de contaminantes, lo que facilita la eliminación final de los efluentes industriales. (Flowen, 2022).

### **2.2.7. OTRAS ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO**

El potencial contaminante y el contenido nutritivo del suero de leche ha impulsado la creación de tecnologías para su utilización. En Argentina se producen anualmente unas 450.000 toneladas de lactosuero líquido, de las cuales el 62% se utiliza en alimentación animal, el 33% se transforma en derivados de la lactosa, caseínas, caseinatos y concentrados proteicos, el 4%

se convierte en lactosuero en polvo y sólo el 1% se trata como efluente. (Fabregas, 2024). No hay datos concretos sobre el uso del suero en nuestro país, pero se estima que sólo se utiliza alrededor del 10%. Las alternativas para utilizar el lactosuero pueden ser:

**Fermentación.** El suero de leche puede servir como medio de cultivo para la obtención de biomásas (proteínas unicelulares como levaduras para panadería), metabolitos (grasas, pigmentos, alcohol, ácidos orgánicos, polímeros bioactivos) y enzimas. Como fuente primaria de carbono para los microorganismos, la lactosa es utilizada en esta aplicación, y hasta se ha empleado para las células vegetales. Además, el suero de leche se utiliza comúnmente para la preservación y multiplicación de cultivos lácticos o en la fabricación de bebidas fermentadas.

**Producción de bebidas.** Poseen un alto potencial para ser utilizados en programas gubernamentales enfocados en poblaciones de bajos recursos.

**Producción de biofertilizantes.** Estos abonos no solo proveen nutrientes eficientemente a las plantas, sino que también reponen la comunidad microbiana del entorno agrícola. Además, la presencia de ácido láctico ayuda a erradicar bacterias patogénicas. Este bioabono puede reemplazar los fertilizantes químicos.

**Tecnología de envasado.** El lactosuero se utiliza para producir de forma fermentativa un ingrediente antimicrobiano utilizado en la producción de envases comestibles. Se obtienen así películas biodegradables con actividad antibacteriana, que prolongan la vida útil y mejoran la conservación de los alimentos. (Fabregas, 2024).

### **2.2.8. USOS DEL LACTOSUERO**

El suero, un subproducto de la industria láctea, tiene una amplia gama de aplicaciones y usos. Puede utilizarse como ingrediente en diversos productos alimenticios como productos horneados, carnes, sopas y bebidas prebióticas (O'Donoghue & Murphy, 2023) . Los ingredientes a base de suero tienen propiedades funcionales que mejoran la textura y las propiedades químicas de los productos de panadería, haciéndolos adecuados como sustitutos de grasas, emulsionantes y potenciadores del sabor (S. et al., 2022) .

Además, el suero se puede utilizar para producir compuestos de alto valor como proteína de suero y  $\beta$ -galactosidasa (Murata et al., 2023). La utilización del suero de manera sostenible puede conducir al desarrollo de productos de valor agregado como suero en polvo, alimentos y bebidas funcionales, ácido láctico, bioplásticos y biocombustibles (Zandona, 2021) .

Sin embargo, el suero se puede utilizar como sustrato para la producción de pigmentos naturales, que pueden mejorar el color y las propiedades antioxidantes de los productos alimenticios (Poonia & Pandey, 2022). En general, las diversas aplicaciones y usos del suero contribuyen a la economía circular y al desarrollo de una bioeconomía.

### **2.2.9. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Las bacterias lácticas (BAL) son un consorcio diverso de microorganismos conocidos por producir ácido láctico mediante la fermentación de hidratos de carbono. Son cocos o bacilos grampositivos que no forman esporas. No son móviles, son anaerobios o microaerofílicos y dan negativo en las pruebas de la oxidasa y la catalasa. Las BAL están ampliamente distribuidas

en la naturaleza y se han aislado de diversas fuentes, como alimentos, plantas y hábitats animales, incluido el tubo digestivo. (Requena, 2019)

Las bacterias lácticas ácido desempeñan una función fundamental en la industria alimentaria gracias a su aporte significativo al sabor, aroma, textura, propiedades sensoriales, beneficios terapéuticos y valor nutricional de los productos alimenticios. Además, se han utilizado en la producción de alimentos fermentados, como el queso, el yogur, el chucrut, el kimchi, entre otros. (Requena, 2019). También se han utilizado en la producción de ácido láctico, que se utiliza en la producción de bioplásticos, productos farmacéuticos, productos químicos y alimentos funcionales.

La elaboración de ácido láctico se realiza mediante especies de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, utilizando lactosuero como sustrato de crecimiento. Sin embargo, algunas cepas de LAB no pueden crecer en condiciones de alto rendimiento debido a sus requerimientos nutricionales complejos no satisfechos. Por esta razón, algunos autores han incorporado extracto de levadura al lactosuero o han desarrollado métodos que mantienen las células en estados no proliferantes. (Lima de Jesús et al., 2021).

Actualmente, se ha investigado el potencial de las bacterias ácido lácticas en la producción de alimentos funcionales y en la salud humana. Se ha demostrado que algunas cepas de bacterias lácticas tienen propiedades probióticas, lo que significa que pueden mejorar la salud intestinal y reducir el riesgo de enfermedades gastrointestinales. Además, se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas tienen propiedades antimicrobianas, antioxidantes

y antiinflamatorias, lo que las hace útiles en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas. (Pintado-Vallejo et al., 2018).

### 2.2.9.1 RUTAS DE FERMENTACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Estas bacterias pueden ser obligadas o facultativas homofermentativas, lo que conduce a la producción de ácido láctico, siendo *L. casei* una de ellas que produce ácido láctico L. En la **tabla 4** se pueden observar las rutas de fermentación homofermentativas y heterofermentativas.

**Tabla 4.** Bacterias ácido láctico homo y heterofermentativas

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

**Fuente.** (Dosuky, 2022)

Este género de bacterias ácido lácticas (BAL) generalmente tolera un pH inferior a 5,0 y una temperatura entre 20 y 45°C, lo que los hace más competitivos frente a otros géneros de



bacterias en condiciones de bajo pH y temperatura intermedia. La temperatura ideal para la producción de ácido láctico mediante *Lactobacillus casei* es de 37°C. (R et al., 2006). Para el aislamiento de bacterias ácidas lácticas, es fundamental conservar características ácidas en el medio de cultivo en un ambiente microaerófilico. Por lo tanto, el medio Man Rogosa Sharpe (MRS) es beneficioso para las bacterias ácidas lácticas debido a su composición y condiciones de cultivo que favorecen su crecimiento y selección.

### 2.2.9.2 STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

La bacteria *Streptococcus thermophilus* es una bacteria termofílica que crece bien a temperaturas de 45 °C y es capaz de producir ácido láctico por fermentación de la glucosa. (Edith et al., 2018). Se ha demostrado que esta bacteria, cuando se consume en productos lácteos fermentados, como el yogur, puede mantener su viabilidad a lo largo del tracto intestinal, lo que confirma su capacidad para sobrevivir en el ambiente ácido del estómago y colonizar el intestino. (Trabazo L, 2006).

Además, se ha observado que la administración de leche fermentada que contiene *Streptococcus thermophilus*, junto con otras cepas probióticas, (R et al., 2006) puede reducir el reservorio nasal de bacterias potencialmente patógenas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, lo que sugiere un posible efecto beneficioso en la salud respiratoria. (Oliveira & González-Molero, 2016). Estos hallazgos respaldan el potencial probiótico de *Streptococcus thermophilus* y su papel en la promoción de la salud intestinal y respiratoria. En la **Tabla 5**, se detalla la taxonomía de *Streptococcus thermophilus*.

**Tabla 5.** Taxonomía de *Streptococcus thermophilus*.

Taxonomía	
<b>Género:</b>	Streptococcus
<b>Especie:</b>	Streptococcus Thermophilus
<b>Familia:</b>	Streptococcaceae
<b>Orden:</b>	Lactobacillales
<b>Clase:</b>	Bacilli
<b>División:</b>	Bacilli
<b>Reino:</b>	Bacteria

**Fuente:** (Soille, 2019)

### 2.2.9.3. *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. LACTIS*

*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* es una bacteria ácido láctica (BAL) que se encuentra incluida en productos lácteos fermentados, como el queso y el yogur. Se ha demostrado que esta bacteria tiene propiedades probióticas, lo que significa que puede mejorar la salud intestinal y reducir el riesgo de enfermedades gastrointestinales. (Requena, 2019). En la **Tabla 6**, se detalla la taxonomía de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*.

Además, se ha investigado su potencial uso en la producción de alimentos funcionales y en la salud humana. Un estudio reciente examinó la cepa CIDCA 133 de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y su potencial como probiótico. Se demuestra que esta cepa tiene

propiedades inmunomoduladoras y puede tolerar altas concentraciones de sales biliares. (Anadón et al., 2021).

También, se identificaron los mecanismos moleculares potenciales asociados con los efectos probióticos de esta cepa. Otro estudio comparó las secuencias genómicas de diferentes cepas de *Lactobacillus delbrueckii*, incluidas las cepas de las subespecies *lactis* y *bulgaricus*. (Lima de Jesús et al., 2021).

Se encontró que las cepas de la subespecie *bulgaricus* tienen genomas más pequeños que las cepas de la subespecie *lactis*. Se identificaron diferencias en las capacidades metabólicas y de adaptación al ambiente lácteo entre las dos subespecies. (Lima de Jesús et al., 2021).

**Tabla 6 .** Taxonomía de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*.

Taxonomía	
<b>Género:</b>	Lactobacillus
<b>Especie:</b>	Lactobacillus delbrueckii
<b>Subespecie</b>	Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis

**Fuente:** (De Jesús et al., 2021).

#### 2.2.9.4. LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS

*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* es una bacteria ácido láctica (BAL) comúnmente encontrada en productos lácteos fermentados, como el queso y el yogur. *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* es utilizada extensivamente como starter en la fabricación de yogurt. (Anadón et al., 2021).

La bacteria puede tolerar altas concentraciones de sales biliares y tiene propiedades inmunomoduladoras. Los genomas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* son más pequeños que los de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (Kafsi et al., 2014). La bacteria puede metabolizar diferentes carbohidratos y tiene diferencias en sus capacidades metabólicas y de adaptación al ambiente lácteo en comparación con *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*. En la **Tabla 7**, se expone la taxonomía de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

**Tabla 7 .** Taxonomía de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

Taxonomía	
<b>Género:</b>	Lactobacillus
<b>Especie:</b>	Lactobacillus delbrueckii
<b>Subespecie</b>	Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus.

**Fuente:** (Malaka, 2020)

## 2.3. ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico, ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido  $\alpha$ -hidroxi propanoico, es un compuesto orgánico que desempeña un papel fundamental en diversas aplicaciones industriales y alimenticias. (Colmenares, 2023)

Se produce a partir de la fermentación de azúcares, como la lactosa en el suero de leche, por bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus*. Este ácido se utiliza en la industria alimentaria como acidulante, conservante, potenciador de sabor y agente de fermentación. (Segovia-Hernández et al., 2022)

Además, el ácido láctico es un componente clave en la producción de polímeros biodegradables, como el PLA (ácido poliláctico), que se utiliza en envases y productos plásticos. Su versatilidad y su origen natural lo hacen atractivo para una amplia gama de aplicaciones sostenibles. (Palma, 2023)

### 2.3.1 ESTRUCTURA DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es un ácido carboxílico que posee un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo. Este carbono asimétrico genera actividad óptica, lo que significa que el ácido láctico puede existir en dos formas estereo isoméricas, conocidas como isómeros ópticos: D(-) láctico y L(+) láctico. (Segovia-Hernández et al., 2022). La **figura 1** muestra estas dos formas desarrolladas de los isómeros ópticos del ácido láctico.



**Figura 1.** Estructura del ácido láctico. (Cedeño, 2020)

### 2.3.2 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico se puede obtener por síntesis química a partir de acetaldehído ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) con cianuro de hidrógeno ( $\text{HCN}$ ) o mediante vía fermentativa biotecnológica utilizando bacterias ácido lácticas. La necesidad de obtener un ácido láctico ópticamente puro ha direccionado a una producción biotecnológica. (Guridi, 2019)

#### 2.3.2.1 SEPARACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR DESTILACIÓN REACTIVA

El proceso comienza con la hidrólisis del lactato de metilo para producir ácido láctico. Luego, se utiliza un proceso de destilación reactiva para separar el ácido láctico de otros componentes. La destilación reactiva es un proceso que combina la destilación con una reacción química para producir un producto más puro. En este caso, el ácido láctico se separa del lactato de metilo mediante hidrólisis. El proceso de destilación reactiva se lleva a cabo en una columna de destilación, donde se añade un catalizador para acelerar la reacción química. El ácido láctico se separa del lactato de metilo y se recupera como un producto puro. (Alzate, 2004).

### 2.3.2.2 FILTRACIÓN CON MEMBRANAS

Este proceso consta de la fermentación de sustancias ricas en monosacáridos o disacáridos por microorganismos, como *Lactobacillus*. La fermentación produce ácido láctico, que se separa y purifica utilizando tecnologías de filtración con membranas. Las membranas se utilizan para separar el ácido láctico de otros componentes, como las células microbianas y los subproductos de la fermentación. El proceso de filtración con membranas es un método eficiente y sostenible para la separación y purificación de ácido láctico. (Guridi, 2019)

### 2.3.2.3 FERMENTACIÓN CON LACTOSUERO

El proceso de producción de ácido láctico a partir de lactosuero implica la fermentación del lactosuero por bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus*. Durante la fermentación, los microorganismos convierten la lactosa en ácido láctico. El ácido láctico se separa y purifica utilizando tecnologías de separación, como la destilación y la extracción líquido-líquido. El proceso de producción de ácido láctico a partir de lactosuero es una forma eficiente y sostenible de aprovechar este subproducto de la industria láctea. (Palma, 2023)

### 2.3.3. MÉTODOS PARA LA MEDICIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En la **Tabla 8** se detallan los métodos para determinar el ácido láctico.

**Tabla 8**, Métodos para determinar ácido láctico.

Método	Descripción	Aplicación
Titulometría	Norma NTE INEN 13:2015	Industria láctea

Métodos enzimáticos	<p><b>- Espectrofotométrico</b></p> <p>En este método se utilizan la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) oxidasa. El lactato se oxida a piruvato, mientras que la coenzima se reduce a NADH, que puede medirse por su absorbancia a 340 nm.</p> <p><b>- Fluorescencia</b></p> <p>Utilizando la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), el lactato puede cuantificarse mediante su excitación a 535 nm y su emisión a 587 nm.</p> <p><b>- Colorimétrico</b></p> <p>La enzima LOx cumple el papel de catalizador en la oxidación aeróbica del lactato, liberando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En contacto con 4-aminoantipirina y la enzima peroxidasa-HRP, se produce un cromógeno que puede identificarse a 565 nm.</p>	<p>Producción industrial de ácido láctico</p> <p>Diagnóstico médico</p> <p>Fermentación</p>



	<p><b>- Biosensores</b></p> <p>La detección de lactato en productos lácteos se consigue utilizando un electrodo amperométrico acoplado con LOx, un polímero y una capa de óxido de indio y estaño.</p>	
<p>Resonancia magnética nuclear de protones</p>	<p>Durante procesos de fermentación, permite distinguir la participación de distintos ácidos orgánicos. Detecta moléculas específicas basándose en espines de los átomos presentes, generalmente hidrógeno y carbono.</p>	<p>Diagnóstico médico Procesos fermentativos</p>

Cromatografía de gases acoplada a masas	Detectar el compuesto de interés basándose en su tiempo de retención, utilizando columnas de separación en presencia de residuos no volátiles que se adhieren a ella.	Procesos fermentativos
Cromatografía líquida	Identifica cuantitativamente los ácidos orgánicos de interés basándose en su tiempo de retención. Emplea columnas de intercambio iónico y detectores como el índice de refracción, UV-VIS y DAD.	Fermentación a partir de residuos agroindustriales
Colorimetría	<p>- El analito se oxida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para formar acetaldehído, lo que le permite reaccionar con el hidroxifenilo en presencia de iones de cobre. La absorbancia se mide a 560 nm.</p> <p>- El analito sufre una reacción colorimétrica con el tricloruro férrico, que da lugar a la formación de iones lactato y tricloruro férrico. La absorbancia se mide a 390 nm.</p>	Ensilaje
Espectroscopia FT-IR	Método cuantitativo, permite detectar grupos funcionales de interés visibles en un rango determinado de longitud de onda	Varios

Gravimetría	Análisis cuantitativo que utiliza Ba(OH) <sub>2</sub> tras tratar la muestra con HCl y Na <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ). Tras la reacción, el peso del precipitado de sulfato de bario se correlaciona con la cantidad de ácido láctico.	Ensilaje
-------------	--	----------

**Fuente.** (Calvopiña & Betancourt, 2020)

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se detalla la preparación, selección y tratamiento de la materia prima (Lactosuero), el proceso de activación, inoculación y conservación de las bacterias del género *Lactobacillus* y *Streptococcus*, el diseño experimental aplicado, el procedimiento de obtención del ácido láctico, su caracterización, así como también la evaluación de sus grupos funcionales.

#### 3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El desarrollo de este trabajo de titulación constituye en un tipo de investigación cuantitativa y experimental, el mismo que consistió en recopilar y analizar datos estadísticos con resultados numéricos con respecto a la calidad de materia prima así mismo como a la cuantificación del ácido láctico mediante análisis fisicoquímicos de los sueros de la leche y la caracterización del ácido láctico mediante acidez titulable y pH.

La investigación llevada a cabo fue un estudio experimental, ya que incluía tres variables no probadas en condiciones científicamente aceptables, en las que se podía controlar el proceso de investigación para interpretar los resultados obtenidos.

### 3.1.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

En este estudio se llevó a cabo una investigación experimental de naturaleza cuantitativa, en el que se analizó tres variables independientes, como factor "A" el efecto de suplementos en el suero de leche, los mismos que fueron el extracto de levadura y  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . a diferentes concentraciones % (m/v), así mismo variables con suero desproteinizado y sin desproteinizar, con respecto a tratamientos control sin suplemento, como factor "B" la temperatura de fermentación, con las bacterias lácticas así como también los medios de cultivo identificando el más favorable y como factor "C" el tiempo de fermentación en cada unidad experimental.

#### *Matriz experimental*

Se prepararon cuatro formulaciones diferentes de sustratos para cada método, con su respectiva muestra de lactosuero, con la finalidad de determinar qué formulación produciría la mayor cantidad de ácido láctico. Las cantidades utilizadas para esta evaluación se presentan en la **Tabla 9**:

#### **Factor "A"**

<b>Formulación lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos</b>	<b>Formulación lactosuero desproteinizado y sin suplementos</b>
--	---

Lactosuero	250 mL	Lactosuero	250 mL
Desprotonación.	NO	Desprotonación.	SI
Extracto de levadura.	NO	Extracto de levadura.	NO
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	NO	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	NO
<b>Formulación lactosuero sin desproteínizar y con suplementos</b>		<b>Formulación lactosuero desproteínizado y con suplementos</b>	
Lactosuero	250 mL	Lactosuero	250 mL
Desprotonación.	NO	Desprotonación.	SI
Extracto de levadura.	2,5g	Extracto de levadura.	2,4g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	4,8g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	4,8g

**Tabla 9** Formulaciones utilizadas

**Factor "B"**

Temperatura de fermentación
37°C
42°C

**Tabla 10** Factor temperatura

**Factor "C"**

Tiempo de fermentación
72 h
96 h

**Tabla 11** Factor tiempo

### 3.1.2.1. MEDIO DE CULTIVO

En este punto se realizaron dos medios de cultivo para inocular las bacterias ácido lácticas Choozit MY 800 LYO 5 DCU con la finalidad de encontrar el medio con el que se consiga una mejor propagación de las bacterias.

El primer medio que se utilizó para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas de inoculación directa fue el Caldo Nutritivo de la empresa <sup>TM</sup> MEDIA, TITAN BIOTECH LTD., dicho caldo permite el enriquecimiento, cultivo y aislamiento de diferentes tipos de bacterias ácido lácticas, incluyendo las utilizadas en este proyecto, a continuación en **Tabla 12** se muestra la composición de este medio de cultivo.

Componente	Gramos por litro de agua destilada (g/L)
Tejido animal de digestión péptica	5
Cloruro de sodio	5
Extracto de remolacha	1.50
Extracto de levadura	1.50

**Tabla 12**

Composición del medio de cultivo de caldo nutritivo.

El segundo medio de cultivo para sembrar las bacterias fue el lactosuero, este medio es un subproducto de la fabricación de quesos y yogurt que contiene lactosa, vitaminas y minerales, los cuales pueden nutrir a las bacterias ácido lácticas y promover su crecimiento.

El suero de leche ofrece un ambiente similar al encontrado en aplicaciones lácteas típicas, haciendo que sea un medio más natural y específico para la propagación de estas bacterias, en comparación con otros medios de cultivo. A continuación en la **Tabla 13** se muestra su composición:

**Tabla 13** Composición promedio del lactosuero.

Parámetro	Valor %
Agua	93,2
Lactosa	4,85
Proteínas solubles	0,80
Grasa	0,50
Vitaminas y minerales	0,60
Ácido Láctico	0,05
Sólidos totales	0,6
Calcio	0,4

### 3.2 POBLACIÓN

Y

#### MUESTRA

Los sueros de leche se obtuvieron de la parroquia de Zhoray ubicada en el Noroeste de Azogues, a una altura de 2494 msnm, con coordenadas SUR 02°34'27" y OESTE 78°38'54". Y de la empresa Nutri del cantón Cañar Hcda. San Antonio Panamericana Norte Km. 80 vía Durán - Tambo, se recolectó en envases de vidrio previamente esterilizados y transportados hasta el laboratorio de microbiología de ciencias de la vida y fueron almacenados a 5.6 °C en refrigeración.

Los microorganismos que se utilizaron fueron una cepa de cultivos lácticos liofilizados de inoculación directa de la empresa **AGRO AUSTRO**, ubicada en la ciudad de Cuenca en las calles 10 de agosto y Antono Ramirez. Bajo el nombre de Choozit MY 800 LYO 5 DCU, los cuales contienen tres bacterias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*), misma cepa es utilizada para la elaboración de queso y yogurth , se escogió estas bacterias ya que siguen la ruta homofermentativa para la producción de ácido láctico.

### **3.3 VARIABLES**

#### **3.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE**

**Parámetros fisicoquímicos:** Temperatura, pH, tiempo de fermentación.

#### **3.4. RECOGIDA DE DATOS**

Se empleó la técnica de observación cuantitativa, en la cual los resultados obtenidos se fundamentan en métodos de análisis estadísticos numéricos. Se recolectaron datos relacionados con valores numéricos, tales como el pH y la acidez.

- **Instrumentos de observación libre:**
  - Cuaderno para tomar apuntes
  - Teléfono o cámara para tomar fotos
  - FT-IR



### **3.5. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**

#### **3.5.1. RECEPCIÓN DE LA MATERIA PRIMA**

Se contó con 6 litros de lactosuero de cada empresa, los mismos que fueron colectados, etiquetados y transportados en recipientes herméticos con capacidad de 1L previamente esterilizados. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de microbiología de ciencias de la vida y se almacenaron a 5 °C hasta el momento de su análisis fisicoquímico así como también para el proceso de desproteinización. Todos los análisis se realizaron por triplicado en días diferentes.

##### **3.5.1.1 ANALISIS FISICOQUÍMICO**

En esta sección se realizó la medición del pH y acidez de los lactosueros para comprobar la composición para utilizarlo como materia prima para el proceso de obtención de ácido láctico.

#### **OBJETIVO 1**

Determinación de los parámetros fisicoquímicos del lactosuero provenientes de las industrias lácteas mediante pruebas de laboratorio, comprobando las mejores condiciones de fermentación.

##### **3.5.1.2. MEDICIÓN DE pH**

La cuantificación de pH se llevó a cabo con la ayuda de un pH-metro digital (SevenMulti-METTLER TOLEDO) es un instrumento científico que analiza la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas indicando su grado de acidez o alcalinidad, el pH es un

punto crucial en el proceso de fermentación de las bacterias ácido lácticas, se realizó en un volumen de 50 mL de lactosuero puro. Dicha prueba se realizó por triplicado.



**Fig. 2** Medición del pH.

### 3.5.1.2. MEDICIÓN DE LA ACIDEZ

La acidez expresada en porcentajes de ácido láctico se cuantificó mediante acidez titulable de acuerdo al método de ensayo a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 13, se siguió el procedimiento de acorde a la norma antes mencionada, posteriormente se colocó el equipo necesario para realizar la titulación como se muestra en la **Figura 3** en el que se transfirió 20 g de muestra al Erlenmeyer depositando la solución estandarizada de NaOH al 0,1 N y Fenolftaleína como indicador hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos de 30 segundos.

La acidez expresada en porcentaje de ácido láctico del suero se calcula con la siguiente ecuación:

#### **Ecuación 1**

$$A = 0,090 \frac{V * N}{ml - m} * 100$$

**Donde:**

**A** = acidez titulable del suero en porcentaje en masa de ácido láctico.

**V** = volumen de la solución de hidróxido de sodio (cm)

**N** = normalidad de la solución de hidróxido de sodio

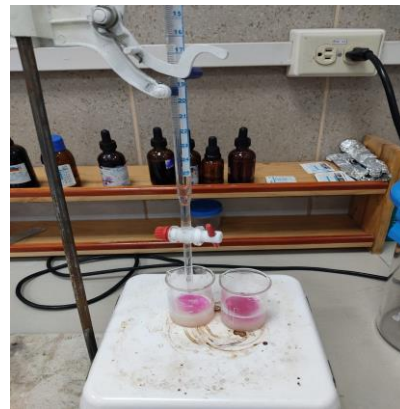
**m** = masa del matraz Erlenmeyer vacío (g)

**m1** = masa del matraz Erlenmeyer con suero (g)

**0,090** = miliequivalente del ácido láctico.



**Fig 3** Equipo de titulación.



**Fig 4** Obtención del color rosado por 30s.

### 3.5.1.3. OBJETIVO 2

Obtención de ácido láctico mediante vía fermentativa de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* para análisis cualitativo del ácido láctico obtenido mediante FT-IR verificando sus grupos funcionales.

Para este objetivo se analizaron cuatro pruebas como se muestran en la **Tabla 9**, en cuanto a la suplementación de los caldos de fermentación fueron dos, en Caldo Nutritivo y en Lactosuero, este procedimiento se basó en estudios realizados (Calvopiña & Betancourt, 2020) y (Gálvez Cadena, 2022), midiendo paulatinamente la acidez expresada como ácido láctico durante las 72 horas hasta llegar a las 96 horas, con el fin de obtener las condiciones con mayor % de acidez expresada como ácido láctico.

#### 3.5.1.4. DESPROTONACIÓN DEL LACTOSUERO

Para este procedimiento se calentó 1 L de cada lactosuero a 90°C por 20 minutos **Figura 5**, una vez culminado el tiempo se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 20°C, con ello se logra la precipitación de las proteínas. Al lograr esa temperatura se procedió a filtrar a través de una manta fina **Figura 6** con el fin de separar las partículas que tienen mayor tamaño. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos **Figura 7**. Ya finalizada la centrifugación, se separó la muestra conservando así la parte más acuosa **Figura 8**. Finalmente, se almacenó a temperatura de refrigeración para su uso posterior.



**Figura 5** Calentamiento



**Figura 6** Filtración



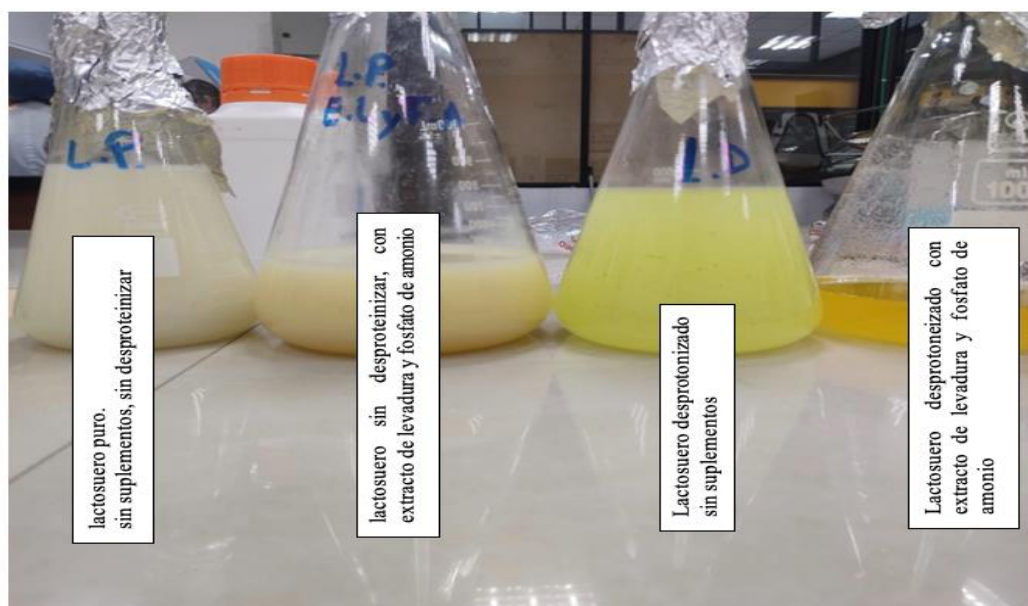
**Figura 7** Centrifugación



**Figura 8** Separación de fases, almacenamiento

### 3.5.2. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS

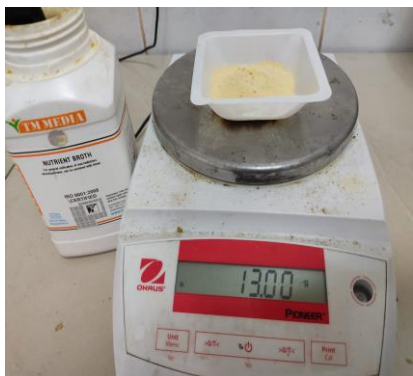
Se colocaron las cantidades estipuladas en la **Tabla 9** en matraces Erlenmeyer, se cubrieron las boquillas con tapones de algodón y papel aluminio, posterior se esterilizaron en el autoclave a 120°C durante 15 minutos (Valdés Rayo et al., 2018), con la finalidad de eliminar microorganismos que pueden causar inconvenientes en el proceso de fermentación. Finalmente se esperó que lleguen a temperatura ambiente y se refrigeraron.



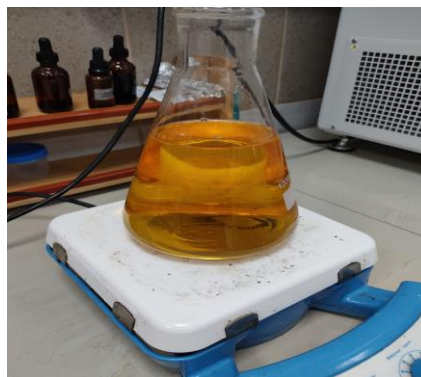
**Figura 9.** Matraces Erlenmeyer con diferentes sustratos.

### 3.5.2.1. PREPARACIÓN DEL CALDO NUTRITIVO

Se preparó el caldo siguiendo las instrucciones del fabricante. En una balanza digital se pesaron 13g del medio de cultivo **Fig 10** y se disolvió en 1L de agua destilada dejando en reposo durante 10 minutos, luego con la ayuda de una hornilla lo calentamos para que las partículas se disuelvan por completo **Fig 11** posterior a ello se colocó en matraces Erlenmeyer, los mismos que se esterilizaron en el autoclave a 120°C durante 15 minutos.



**Figura 10** Peso en gramos del medio de cultivo



**Figura 11** Medio de cultivo disuelto

### 3.5.2.2. PREPARACIÓN DEL LACTOSUERO COMO MEDIO DE CULTIVO

Es importante pasteurizar el lactosuero para eliminar cualquier microorganismo patógeno o competidor. Para ello se calienta el suero a 90°C durante 5 a 10 minutos. Luego se enfría el suero a la temperatura de inoculación recomendada, que generalmente ronda los 30-37 °C.

### 3.5.3. INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

#### 3.5.3.1. INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN CALDO NUTRITIVO

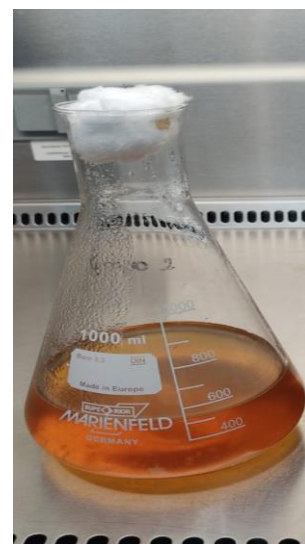
Para este proceso de trabajo en la cámara de flujo previamente esterilizada, se utilizó dos mecheros de Bunsen con la finalidad de esterilizar aún más en área de inoculación **Figura 12**, posterior a eso se colocó dentro los matraces con el caldo y el sobre de las BAL, para la utilización del sobre de las bacterias lácticas se siguió las indicaciones del fabricante con respecto al almacenamiento **Anexo 1** , el sobre con las bacterias se almacenaron a  $< 4^{\circ}\text{C}$ , para utilizarlos en la inoculación, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de abrirlo, con la finalidad de que el desempeño de las BAL no se vea afectado.

En este punto se tuvo 1L de caldo nutritivo distribuido en 4 matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se pesó 5 gramos de las bacterias ácido lácticas, este proceso de medición se realizó 4 veces para colocarlos en cada matraz de Erlenmeyer previamente esterilizados. Se cerraron los matraces con tapones de algodón **Figura 13** posteriormente se llevaron al agitador orbital a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 h, con la finalidad de producir bacterias en gran cantidad.

**Figura 14**



**Figura 12.** Esterilización de la zona



**Figura 13.** Caldo con las BAL



**Figura 14** Bacterias en el agitador orbital

### **3.5.3.1. INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LACTOSUERO**

El lactosuero resulta ser un medio de cultivo muy adecuado para bacterias lácticas, su composición puede ayudar a nutrir las BAL y promover su crecimiento.

Se trabajó de igual manera en la cámara de flujo con mecheros de Bunsen y los materiales previamente esterilizados, ya con el suero preparado se procedió a adicionar el cultivo CHOOZIT MY 800 LYO 5 DCU, la cantidad fue la misma que para el caldo nutritivo, se incubó a 37°C por 24 horas.

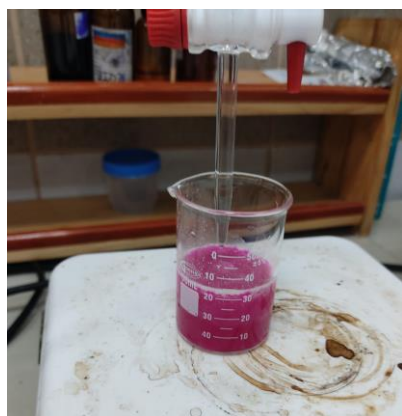
### **3.5.4 FERMENTACIÓN**

Después de transcurrido el tiempo en el agitador orbital los matraces con los diferentes sustratos y las bacterias inoculadas en el caldo nutritivo así como también las que fueron sembradas en el lactosuero, fueron introducidos a la cámara de flujo en donde se prendieron



dos mecheros de Bunsen, y con la ayuda de una pipeta volumétrica se extrajo 50 mL del inóculo y se vertió tal cantidad en cada matraz de Erlenmeyer que contenía los diferentes sustratos.

Las variables experimentales utilizadas fueron los diferentes sustratos que se encontraban en los matraces de Erlenmeyer mencionados con anterioridad. En este punto se volvió a evaluar la acidez expresada como ácido láctico **Figura 15** cuyo proceso está descrito en el **punto 3.6.2.1** en condiciones de esterilidad cada 24 horas, con la finalidad de establecer qué sustrato presenta mayor porcentaje de acidez. Posteriormente se colocaron tapones de algodón y se introdujeron a la incubadora, la fermentación se realizó en dos etapas, la primera a 37°C y la segunda a 42°C, así mismo por 72 horas y 96 horas **Figura 16** y 17



**Figura 15.** Medición de la Acidez



**Figura 16** Incubadora a 37°C



**Figura 17** Temperatura de 42°C

### 3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Los análisis microbiológicos se realizaron siguiendo la metodología descrita en la norma NTE INEN 2594, que establece los requisitos de aceptación o rechazo de la materia prima, que en este caso es el lactosuero destinado a su posterior transformación.

Se obtuvo agua salina al 0,90%, así mismo el agar MRS siguiendo las instrucciones del fabricante. El agar se colocó en cajas Petri y fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, con la finalidad de verificar la esterilidad de las mismas. Así mismo el material a utilizarse fue previamente esterilizado en el autoclave a 120°C por 15 minutos.

Para la siembra, se partió de la unidad de muestra de 1000 mL, se tomó 0,1 mL de suero de leche **Figura 18**, con la ayuda de tubos de ensayo y micropipetas, se realizó una dilución de  $10^{-3}$  y posteriormente se sembró en las cajas petri de agar **Figura 19**, se esparce la muestra de manera horaria y antihoraria, con el fin de que este se disperse por toda la paca, se dejó reposar por 15 minutos para que se solidifique y finalmente se llevó a la incubadora a 37°C por 24 horas.



**Figura 18** Toma de muestra



**Figura 19** Distribución en cajas Petri

### 3.7 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Transcurrido el tiempo de fermentación previamente establecido, se transfirieron 200 mL de los diferentes caldos a tubos Falcon, que se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos

**Fig 20.** El sobrenadante resultante se filtró con un paño estéril **Fig 21.**



**Fig 20.** Centrifugación



**Fig 21.** Filtración

### 3.7.1 FILTRADO AL VACÍO

Posteriormente, el producto se filtró utilizando una bomba de vacío para separar la parte sólida **Fig 22**, formada por células microbianas, de la parte líquida, formada por enzimas lactasa. Este proceso consiguió una mayor purificación al eliminar la mayor parte de la biomasa presente en el caldo fermentado.



**Fig. 22** Filtración al vacío

### 3.7.2. DESTILACIÓN SIMPLE

Dado que el ácido produce ésteres internos con un alto punto de ebullición, se aplicó aquí un sencillo proceso de destilación. Se trata de una técnica de laboratorio utilizada para separar sustancias miscibles con diferentes puntos de ebullición. El caldo fermentado es una mezcla homogénea de lactato, agua y otros componentes con diferentes puntos de ebullición.

Para realizar este proceso, se vertieron 150 mL del caldo fermentado en un matraz de destilación y se conectaron a un tubo condensador. Se activó la circulación de agua fría a través de mangueras hasta el condensador, y se colocó un vaso de precipitados en el otro punto del destilador para recoger el componente evaporado. **Fig 23.** Se aplicó calor con un mechero Bunsen, provocando la evaporación de los componentes más volátiles, incluida el agua, teniendo en cuenta que el punto de ebullición que debe tener el ácido láctico es de 120°C y el punto de ebullición de agua es de 95°C. El producto concentrado, en este caso es el ácido láctico, fue sometido a una prueba de caracterización para analizar la pureza del producto final **Fig 24.**



**Fig. 23.** Equipo de destilación



**Fig 24.** Producto final

### **3.7.3. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ÁCIDO LÁCTICO**

#### **3.7.3.1. ACIDEZ TITULABLE**

El producto obtenido se evaluó por el método de acidez titulable expresado como gramos de ácido láctico, siguiendo el método de ensayo especificado en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 13:2015.

Se prepara la solución 0,1N de hidróxido de sodio y la solución indicadora de fenolftaleína.

Se mezcló la muestra para así obtener una solución homogénea, manteniéndola a una temperatura aproximada de 20°C.

En un matraz de Erlenmeyer seco y previamente esterilizado se pesa con la ayuda de una balanza digital una determinada cantidad de la muestra y se registra el valor, luego se añade 3 gotas de la solución indicadora de fenolftaleína como indicador y se titula con una solución estandarizada de 0,1N de hidróxido de sodio previamente colocado en una bureta, esto hasta conseguir un color rosado persistente durante al menos 30s. Ver **Anexo 2**

### **3.7.3.2. DETERMINACIÓN DEL pH**

Este punto se realizó con un instrumento de laboratorio con electrodos de inmersión. Se colocó un volumen de muestra en un vaso de precipitación, se introdujo el potenciómetro y se esperó a que este estabilice la lectura del pH. **Anexo 3**

### **3.7.3.3. OBJETIVO 3**

Verificación mediante análisis estadísticos del proceso más efectivo para la obtención de ácido láctico.

La técnica de FT-IR se puede utilizar como un método para evaluar la producción de ácido láctico, al este identificar los grupos funcionales del mismo. Se utilizó un equipo de espectro.

#### **3.7.3.4. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES CARACTERÍSTICOS DEL ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT-IR**

Utilizando el espectrómetro infrarrojo FT-IR marca NICOLET iS10 Thermo SCIENTIFIC.

Se realiza un monitoreo previo del equipo para confirmar su funcionamiento, se acopla la punta para la detección de líquidos, se limpia con la ayuda de un paño y alcohol isopropílico la punta y el cristal, previo a ello, se verifica que la muestra a analizar este a un pH de 5 a 9.

Con el cristal limpio se procede a realizar un barrido de fondo, con la curva previa, posteriormente se coloca una gota de la muestra en el diamante y se da inicio al escáner. La limpieza del diamante se repite con cada muestra a analizar.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 RESULTADOS

##### 4.1.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

Determinación de los parámetros fisicoquímicos del lactosuero provenientes de las industrias lácteas mediante pruebas de laboratorio, comprobando las mejores condiciones de fermentación.

##### 4.1.2 MEDICIÓN DEL pH Y ACIDEZ DE LOS LACTOSUEROS

Este parámetro es crucial en el análisis fisicoquímico, ya que si se encuentra un pH normal según la bibliografía, mejorará el rendimiento y la tasa de crecimiento de las bacterias lácticas, con lo que producirán metabolitos primarios más rápidamente. Por lo contrario, si no existe un pH adecuado, se inhiben las acciones enzimáticas que facilitan las vías metabólicas para la generación del ácido láctico. La **Tabla 25** muestra los resultados obtenidos de la medición de pH en los diferentes lactosueros sin ningún tratamiento previo (Valdés Rayo et al., 2018).

**Tabla 25.** Resultados obtenidos en la determinación del pH en el lactosuero

SUERO 1 ZHORAY	pH
Muestra 1	6.46
Muestra 2	6.68
Muestra 3	6.58



<b>SUERO 1 NUTRI LECHE</b>	<b>pH</b>
Muestra 1	6.39
Muestra 2	6.28
Muestra 3	6.38

### Acidez lactosuero

<b>lactosuero zhoray</b>	0,17	0,23	0,35
<b>lactosuero cañar</b>	0,25	0,16	0,17

De acuerdo a los resultados obtenidos y basados en estudios previos publicados (Calvopiña & Betancourt, 2020), así como también los establecidos en la Norma INEN 2594 en donde se determina el pH óptimo y acidez para realizar tal proceso se puede determinar que ambos sueros presentan porcentajes favorables, resaltando que a pesar de ser obtenidos de diferentes fuentes su composición es la misma, definiendolos como materia prima apta para su proceso.

**Tabla 2.**

### Requisitos físico químicos del Lactosuero

<b>Requisitos</b>	<b>Suero de leche dulce</b>		<b>Suero de leche ácido</b>		<b>Método de ensayo</b>
	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	
Lactosa % (m/m)					
Proteína láctea % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15

Grasa láctea % (m/m)	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Ceniza % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Acidez titulable % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 14
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	NTE INEN 13

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

#### 4.1.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL LACTOSUERO

Los resultados fueron obtenidos mediante el conteo de colonias en platos seleccionados, calculando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por centímetro cúbico de muestra.

**Tabla 26** Resultados de análisis microbiológico del suero de la leche en estudio

Microorganismos	Valores (UFC/g)
Aerobios mesófilos	250
<i>Escherichia coli</i>	NO
<i>Staphylococcus Aureus</i>	NO
<i>Salmonella</i>	NO
<i>Listeria monocytogenes</i>	NO

Con respecto al análisis microbiológico, se evidencio la presencia de 250 UFC/g de *Aerobios mesófilos*, mientras que los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphilococcus*,

*Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, presentaron ausencia en las muestras, tal como es el caso en el trabajo realizado por (Lema Guamán, 2023), por consiguiente, el suero de leche se consideró apto como materia prima para el proceso de obtención de ácido láctico, así también como ingrediente para la aplicación en la industria alimentaria como suplemento dietético y para la elaboración de un subproducto.

#### 4.1.4. MEDICIÓN DE ACIDEZ A LOS MEDIOS YA CONCENTRADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la acidez de los medios ya concentrados con las bacterias:

**Tabla 27.** Datos obtenidos en el método 1

<b>Método 1</b>		<b>Temp. de fermentación</b>				
<b>BAL en Lactosuero</b>		<b>n</b>				
		<b>37°C</b>				
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
<b>Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos</b>	10,26	10,19	10,25	10,65	10,63	10,63
<b>Lactosuero desproteínizado y sin suplementos</b>	7,5	6,8	6,9	8,01	7,93	8,04
<b>Lactosuero desproteínizado y con suplementos</b>	11,48	11,46	11,45	12,13	12,13	12,4
<b>Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos</b>	6,02	6,03	6,02	5,52	6,44	6,41

**Tabla 28.** Datos obtenidos en el método 1

<b>Método 1</b>		<b>Temp. de fermentación 42°C</b>				
<b>BAL en Lactosuero</b>						
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
<b>Lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos</b>	10,3	10,6	9,8	10,45	10,96	10,99
<b>Lactosuero desproteinizado y sin suplementos</b>	7,59	8,03	7,72	7,86	7,45	8,02
<b>Lactosuero desproteinizado y con suplementos</b>	11,4	11,08	11,68	12,01	11,87	11,81
<b>Lactosuero sin desproteinizar y con suplementos</b>	6,47	6,08	6,68	6,02	5,99	6,49

**Tabla 29.** Datos obtenidos en el método 2

<b>Método 2</b>		<b>Temp. de fermentación 37°C</b>				
<b>BAL en caldo nutritivo</b>						
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
<b>Lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos</b>	13,67	13,49	14,01	13,81	13,42	14,14

<b>Lactosuero desproteínizado y sin suplementos</b>	14,76	14,30	14,77	14,9	15,59	14,35
<b>Lactosuero desproteínizado y con suplementos</b>	21,06	20,77	20,97	21,45	21,08	21,68
<b>Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos</b>	15,43	16,33	16,21	15,74	15,42	15,94

**Tabla 30.** Datos obtenidos en el método 2

<b>Método 2</b>		<b>Temp. de fermentación 42°C</b>					
<b>BAL en caldo nutritivo</b>							
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>			
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	
<b>Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos</b>	13,66	12,51	12,78	13,9	13,42	14,33	
<b>Lactosuero desproteínizado y sin suplementos</b>	15,03	14,57	15,40	15,56	15,21	16,22	
<b>Lactosuero desproteínizado y con suplementos</b>	20,13	19,63	20,51	20,66	20,09	21,21	
<b>Lactosuero desproteínizado y con suplementos</b>	16,00	15,57	16,40	16,61	16,09	17,21	

Con respecto a los resultados obtenidos en porcentajes de ácido láctico, resultados similares a los de (Patel, 2016), medidos como acidez titulable del producto concentrado manteniendo el volumen constante durante el proceso de destilación. Se determinó la concentración de ácido láctico en g/L. El análisis se realizó por triplicado para cada grupo experimental, y los resultados se analizaron estadísticamente.

#### 4.1.5. RESULTADOS PROMEDIO DE MEDIDAS DE pH FINAL DE ÁCIDO LÁCTICO

**Tabla 31.** Datos obtenidos en el método 1

<b>Método 1</b>		<b>Temperatura de fermentación 37°C</b>				
<b>caldo nutritivo</b>						
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>			
<b>Lactosuero sin desproteinizar y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,18	2,26	2,32	2,35	2,34	2,30
<b>Lactosuero desproteinizado y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,19	2,27	2,26	2,26	2,34	2,17
<b>Lactosuero desproteinizado y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,28	2,34	2,31	2,33	2,34	2,35
<b>Lactosuero sin desproteinizar y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,45	2,40	2,27	2,67	2,54	2,51

**Tabla 32.** Datos obtenidos en el método 1

<b>Método 1</b>		<b>Temperatura de fermentación 42°C</b>				
<b>caldo nutritivo</b>						
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>			
<b>Lactosuero sin desproteínizar y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,33	2,34	2,30	2,35	2,31	2,30
<b>Lactosuero desproteínizado y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,30	2,33	2,32	2,31	2,32	2,36
<b>Lactosuero desproteínizado y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,30	2,38	2,29	2,34	2,2,35	2,33
<b>Lactosuero sin desproteínizar y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,29	2,28	2,29	2,32	2,30	2,31

**Tabla 33.** Datos obtenidos en el método 2

<b>Método 2</b>		<b>Temperatura de fermentación 37°C</b>				
<b>BAL en Lactosuero</b>						
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
<b>Lactosuero sin desproteínizar y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,26	2,34	2,32	2,29	2,28	2,36
<b>Lactosuero desproteínizado y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,27	2,31	2,32	2,33	2,35	2,31
<b>Lactosuero desproteínizado y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,31	2,21	2,18	2,37	2,31	2,33

<b>Lactosuero sin desproteinizar y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,41	2,37	2,34	2,39	2,35	2,33
--	------	------	------	------	------	------

**Tabla 34.** Datos obtenidos en el método 2

<b>Método 2 BAL en Lactosuero</b>		<b>Temperatura de fermentación 42°C</b>				
<b>Horas de fermentación</b>	<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>			
<b>Lactosuero sin desproteinizar y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,27	2,21	2,20	2,29	2,21	2,31
<b>Lactosuero desproteinizado y sin extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,31	2,34	2,27	2,40	2,34	2,33
<b>Lactosuero desproteinizado y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,28	2,29	2,33	2,33	2,31	2,28
<b>Lactosuero sin desproteinizar y con extracto de levadura y fosfato de amonio.</b>	2,27	2,26	2,28	2,32	2,30	2,27



---

Las tablas con los métodos antes mencionados se refieren a las mediciones de pH y acidez de los sustratos que se enriquecieron con extracto de levadura y fosfato de amonio, en los medios de cultivo de Caldo nutritivo y Lactosuero, midiendo tales parámetros a las temperaturas y horas establecidos, en la **sección 3.1.2** en la **Tabla 9** se aprecia las cantidades estipuladas en este proceso. En el **ANEXO 5** se encuentran las tablas estadísticas detalladas de mejor manera.

#### **4.1.6. VERIFICACIÓN DE LOS GRUPOS FUNCIONALES MEDIANTE FT-IR**

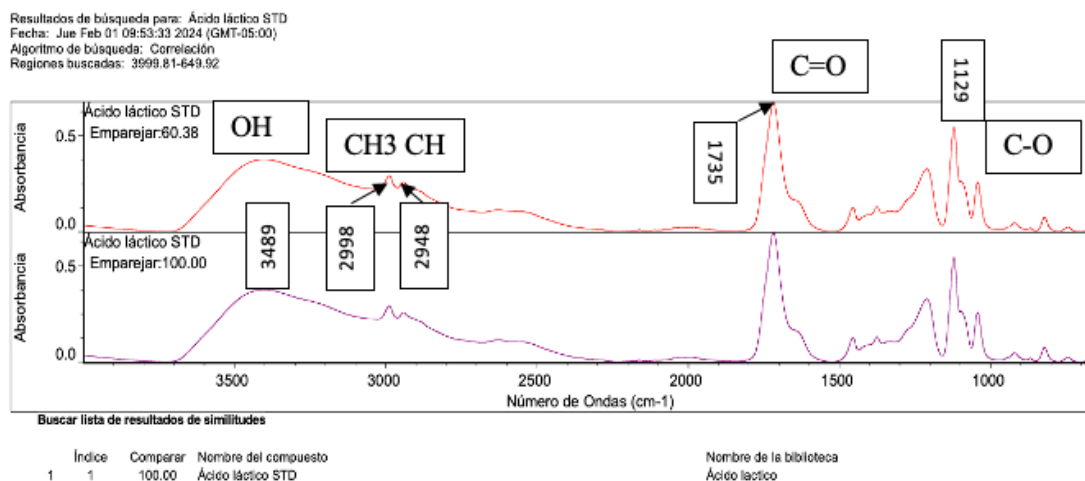
**Obtención de ácido láctico mediante vía fermentativa de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* para análisis cualitativo del ácido láctico obtenido mediante FT-IR verificando sus grupos funcionales**

Se interpretaron los espectros obtenidos en el espectrofotómetro FT-IR al comparar las muestras con el estándar de ácido láctico almacenado en los archivos del equipo. En el **Anexo 4** se puede apreciar el reporte completo.

Los mejores resultados que se obtuvieron fueron las BAL sembradas en el medio de lactosuero, ya que se presenció una propagación mayor de las bacterias, se hizo una comparación al final con ambos medios para verificar con cual se obtiene mayor cantidad de ácido láctico y de mejor calidad. A continuación se puede apreciar los espectros de los medios mencionados en cada figura.

La espectroscopia infrarroja posibilita la identificación de especies químicas al verificar la frecuencia (número de ondas) en la que los diferentes grupos funcionales muestran bandas de absorción en el espectro infrarrojo.

Ácido láctico obtenido del medio de lactosuero enriquecido con extracto de levadura y fosfato de amonio y suero desproteinizado.

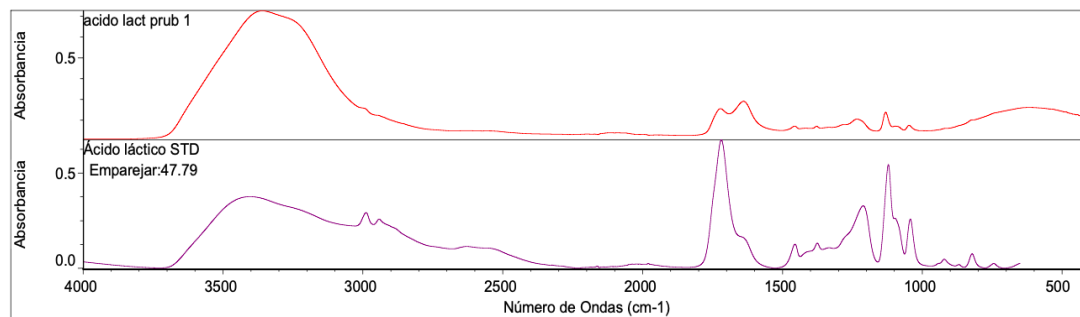


El análisis por espectrometría infrarroja (FTIR) del monómero inicial se realizó en un espectrómetro de marca NICOLET iS10 mediante la técnica de película líquida.

En la **figura 35** se visualizan los resultados obtenidos para el ácido láctico, donde se pueden identificar bandas de alta intensidad a 3489 y 2998  $\text{cm}^{-1}$  aproximados, correspondiendo a la tensión del enlace OH y a la tensión asimétrica del  $\text{CH}_3$  respectivamente, seguidas de una banda a 2948  $\text{cm}^{-1}$  propia de la tensión del  $\text{CH}_3$ . A 1735 y 1129  $\text{cm}^{-1}$  se encuentran dos bandas muy intensas que pertenecen a la tensión de los enlaces C=O y C-O. Además, se puede apreciar una banda menos intensa a 1217  $\text{cm}^{-1}$ , que pertenece al enlace C-O-C.

**Figura 36.** Ácido láctico obtenido del medio con caldo nutritivo sin suero desproteínizado, y suplementado con extracto de levadura y fosfato de amonio.

Resultados de búsqueda para: acido lact prub 1  
 Fecha: Jue Feb 01 09:47:11 2024 (GMT-05:00)  
 Algoritmo de búsqueda: Correlación  
 Regiones buscadas: 3999.81-649.92

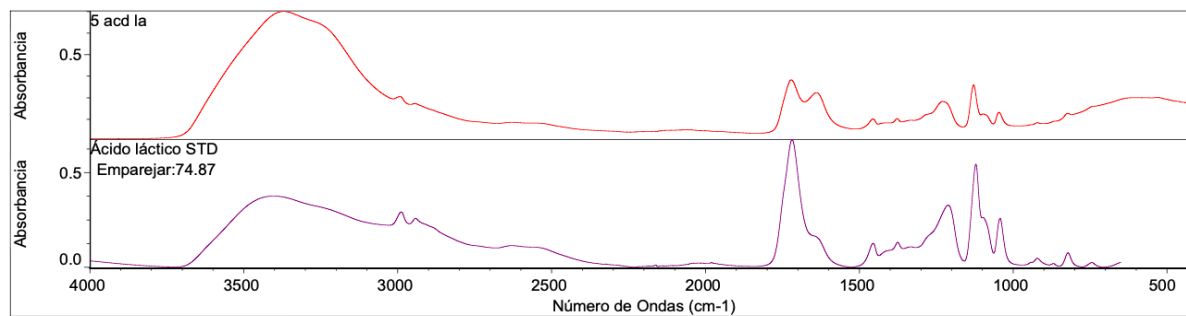


Buscar lista de resultados de similitudes

Índice	Comparar	Nombre del compuesto	Nombre de la biblioteca
1	1	47.79 Ácido láctico STD	Ácido láctico

**Figura 37.** Ácido láctico obtenido del medio de lactosuero enriquecido con extracto de levadura y fosfato de amonio y suero sin desproteínizar.

Resultados de búsqueda para: 5 acd la  
 Fecha: Jue Feb 01 09:58:56 2024 (GMT-05:00)  
 Algoritmo de búsqueda: Correlación  
 Regiones buscadas: 3999.81-649.92



Buscar lista de resultados de similitudes

Índice	Comparar	Nombre del compuesto	Nombre de la biblioteca
1	1	74.87 Ácido láctico STD	Ácido láctico

**Figura 38.** Equipo FT-IR



#### **4.2. Verificación mediante análisis estadísticos el proceso más efectivo para la obtención de ácido láctico**

Culminados con los experimentos que fueron propuestos en el diseño, se procede a analizar las condiciones de fermentación óptimas que maximicen la productividad de ácido láctico, el programa de Excel proporcionó los datos para ANOVA.

Para determinar los mejores parámetros en proceso de fermentación del lactosuero con la BAL *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, se realizaron diferentes análisis estadísticos, los mismos que son detallados a continuación:

#### **Análisis de la acidez a las 72 horas**

Los datos considerados fueron:

**Tabla 1.** Resultados obtenidos de la medición de la acidez a las 72 horas de la fermentación

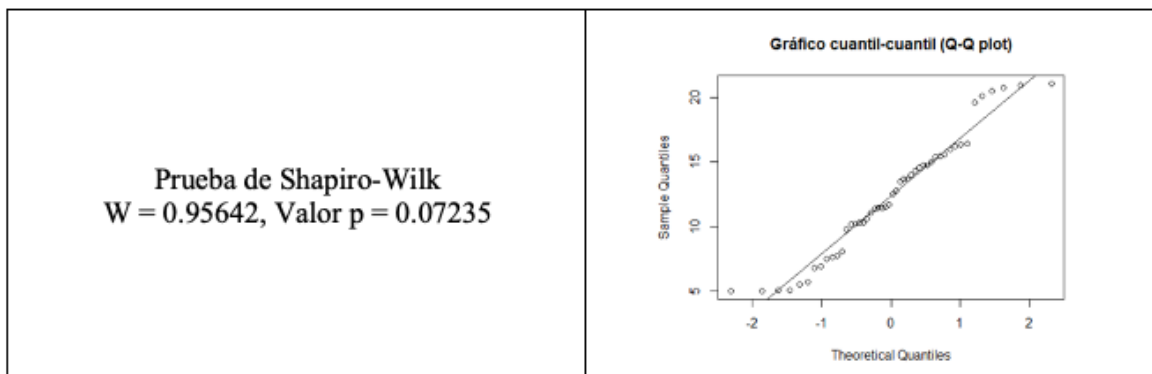
Tratamientos	Repeticiones		
	1	2	3
A	10.26	10.19	10.25
B	7.50	6.80	6.90
C	11.48	11.46	11.45
D	5.02	5.03	5.02
E	10.30	10.60	9.80
F	7.59	8.03	7.72
G	11.40	11.08	11.68
H	5.47	5.08	5.68
I	13.67	13.49	14.01
J	14.76	14.30	14.77
K	21.06	20.77	20.97
L	15.43	16.33	16.21
M	13.66	12.51	12.78
N	15.03	14.57	15.40
O	20.13	19.63	20.51
P	16.00	15.57	16.40

### Evaluación de la distribución normal de los datos

**Hipótesis nula:** los datos presentan distribución normal

**Hipótesis alternativa:** los datos no presentan distribución normal

Considerando el juego de hipótesis se acepta la hipótesis nula (valor  $P > \alpha$ ), por ende, se puede decir que los datos presentaron una distribución normal. Dichos resultados se evidenciaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un Valor  $p = 0.07235$  y el gráfico Cuartil-Cuartil los datos se ubicaron de forma aleatoria en relación a la línea de referencia y no siguen ninguna tendencia.



### Evaluación del modelo ANOVA

**Hipótesis nula:** los tratamientos no presentan diferencia significativa

**Hipótesis alternativa:** los tratamientos presentan diferencia significativa

Considerando el juego de hipótesis, se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P < \alpha$ ), por ende, se puede decir que existe al menos un par de tratamientos que difieren entre si (valor  $P = 2e^{-16}$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la acidez a las 72 horas.

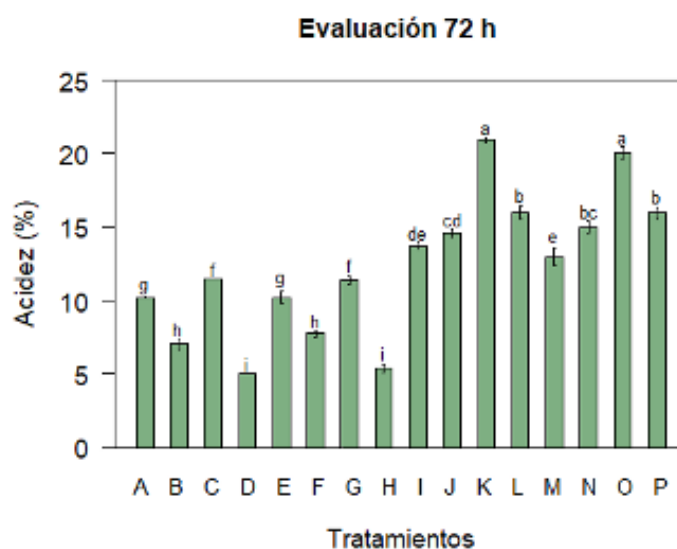
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Tratamientos	15	1007.4	67.16	581.9	$2e^{-16}$
Residuos	32	3.7	0.12		

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

**Tabla 3.** Supuestos del modelo ANOVA para la acidez a las 72 horas.

Independencia	Normalidad	Homogeneidad de varianzas
Prueba de Durbin-Watson DW = 1.56, Valor p = 0.249	Prueba de Shapiro-Wilk W = 0.9757, Valor p = 0.4157	Prueba de Levene Valor p = 0.8094

**Figura 1.** Acidez del ácido láctico evaluado a las 72 h de la fermentación. Tratamiento A (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento B (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento C (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento D (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento E (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento F (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento G (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 42 °C), Tratamiento H (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento I (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento J (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento K (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento L (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento M (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento N (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento O (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento P (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C). Los resultados son expresados como promedio del porcentaje de acidez (%)  $\pm$  DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren al 5%, de acuerdo con la prueba de DSH de Tukey.



En base al análisis estadístico ANOVA, se observó el promedio de la acidez del ácido láctico evaluado a las 72 h de fermentación, para los tratamientos K y O la acidez fue 20,93 y 20,09 (%), respectivamente. El ANOVA mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor  $P = 2e^{-16}$ ) (Tabla 2). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas (Tabla 3). Los dos tratamientos antes mencionados lograron la mayor acidez con las siguientes condiciones BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C y BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 42 °C, respectivamente.

#### ANÁLISIS DE LA ACIDEZ A LAS 96 HORAS

Los datos considerados fueron:

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de la medición de la acidez a las 96 horas de la fermentación

Tratamientos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
A	10,65	10,63	10,63
B	8,01	7,93	8,04
C	12,13	12,13	12,4
D	5,52	6,44	6,41
E	10,65	10,63	10,63
F	8,01	7,93	8,04
G	12,13	12,13	12,4
H	5,52	6,44	6,41

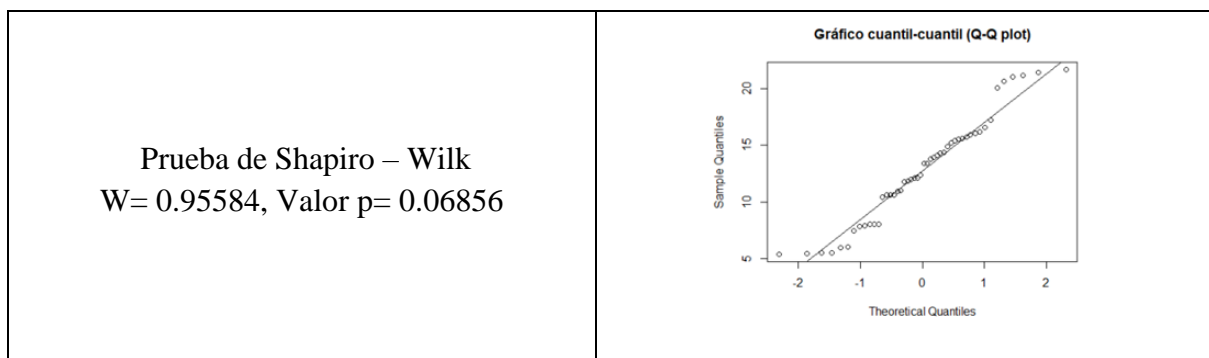


I	13,81	13,42	14,14
J	14,9	15,59	14,35
K	21,45	21,08	21,68
L	15,74	15,42	15,94
M	13,9	13,42	14,33
N	15,56	15,21	16,22
O	20,66	20,09	21,21
P	16,61	16,09	17,21

- **Evaluación de la distribución normal de los datos**

**Hipótesis nula:** los datos presentan distribución normal

**Hipótesis alternativa:** los datos no presentan distribución normal



En base al juego de hipótesis se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P > \alpha$ ), por ende, se puede decir que los datos no presentaron una distribución normal. Dichos resultados se evidenciaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk **Valor  $p = 0.06856$**  y el gráfico Cuartil-Cuartil los datos se ubicaron de forma aleatoria en relación a la línea de referencia y no siguen ninguna tendencia.

- Evaluación del modelo ANOVA

**Hipótesis nula:** los tratamientos no presentan diferencia significativa

**Hipótesis alternativa:** los tratamientos presentan diferencia significativa

Considerando el juego de hipótesis, se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P < \alpha$ ), por ende, se puede decir que existe al menos un par de tratamiento que difieren entre si (valor  $P = 2e^{-16}$ ) (Tabla 5).

Análisis de Varianza (ANOVA) para la acidez a las 96 horas.

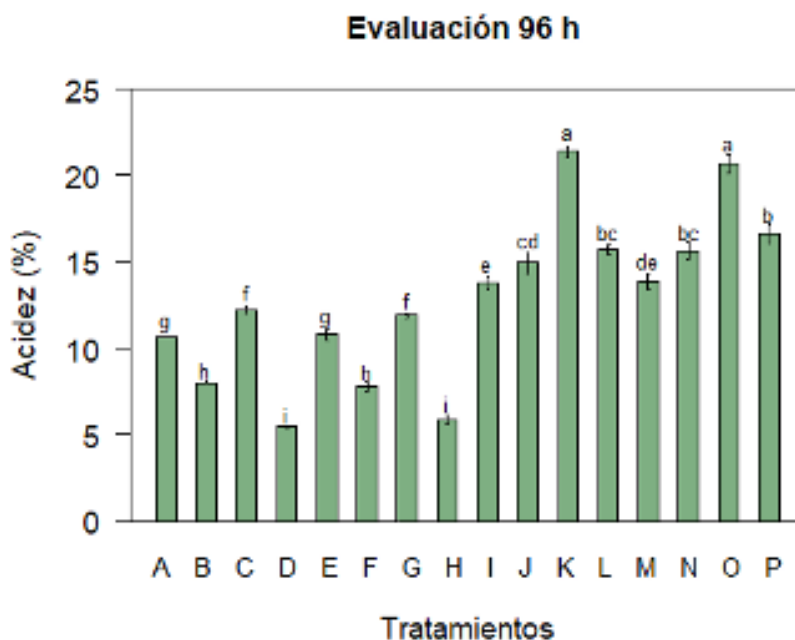
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Tratamientos	15	1003.3	66.88	513.7	$2e^{-16}$
Residuos	32	4.2	0.13		

**Tabla 6.** Supuestos del modelo ANOVA para la acidez a las 96 horas.

<b>Independencia</b>	<b>Normalidad</b>	<b>Homogeneidad de varianzas</b>
Prueba de Durbin-Watson DW = 1.43, Valor p = 0.1201	Prueba de Shapiro-Wilk W = 0.962, Valor p = 0.127	Prueba de Levene Valor p = 0.5153

**Figura 2.** Acidez del ácido láctico evaluado a las 96 h de la fermentación. Tratamiento A (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento B (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento C (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento D (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento E (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento F (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento G (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 42 °C), Tratamiento H (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento I (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento J (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento K (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento L (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C).

desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento M (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento N (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento O (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento P (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C). Los resultados son expresados como promedio del porcentaje de acidez (%)  $\pm$  DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren al 5%, de acuerdo con la prueba de DSH de Tukey.



Con respecto al análisis estadístico ANOVA, se observó el promedio de la acidez del ácido láctico evaluado a las 96 h de fermentación, para los tratamientos K y O la acidez fue 21,40 y 20,65 (%), respectivamente. El ANOVA mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor  $P = 2e^{-16}$ ). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo (independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas). Los dos tratamientos antes mencionados lograron la mayor acidez con las siguientes condiciones BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C y BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C, respectivamente.

### ANÁLISIS DEL pH A LAS 72 HORAS

Los datos considerados fueron:

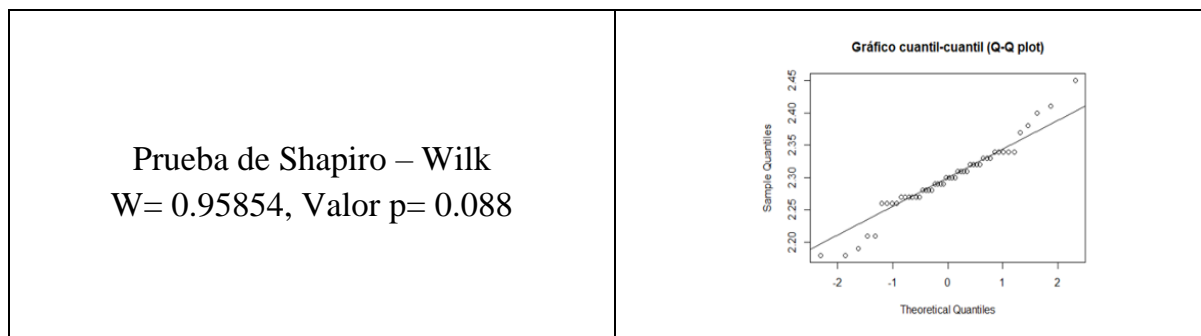
**Tabla 7.** Resultados obtenidos de la medición del pH a las 72 horas de la fermentación

Tratamientos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
A	2,18	2,26	2,32
B	2,19	2,27	2,26
C	2,28	2,34	2,31
D	2,45	2,40	2,27
E	2,33	2,34	2,30
F	2,30	2,33	2,32
G	2,30	2,38	2,29
H	2,29	2,28	2,29
I	2,26	2,34	2,32
J	2,27	2,31	2,32
K	2,31	2,21	2,18
L	2,41	2,37	2,34
M	2,27	2,21	2,20
N	2,31	2,34	2,27
O	2,28	2,29	2,33
P	2,27	2,26	2,28

- **Evaluación de la distribución normal de los datos**

**Hipótesis nula:** los datos presentan distribución normal

**Hipótesis alternativa:** los datos no presentan distribución normal



Considerando el juego de hipótesis se acepta la hipótesis nula (valor  $P > \alpha$ ), por ende, se puede decir que los datos presentaron una distribución normal. Dichos resultados se evidenciaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un Valor  $p = 0.088$  y el gráfico Cuartil-Cuartil los datos se ubicaron de forma aleatoria en relación a la línea de referencia y no siguen ninguna tendencia.

#### - Evaluación del modelo ANOVA

**Hipótesis nula:** los tratamientos no presentan diferencia significativa

**Hipótesis alternativa:** los tratamientos presentan diferencia significativa

Considerando el juego de hipótesis, se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P < \alpha$ ), por ende, se puede decir que hay diferencia entre los tratamientos (valor  $P = 0,0137$ ) (Tabla 8).

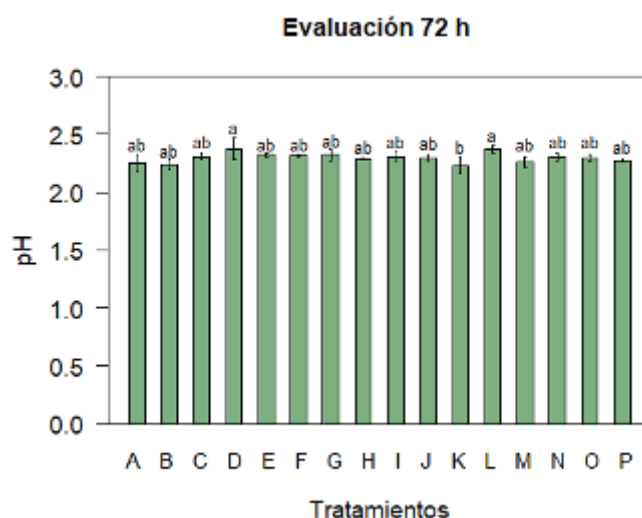
**Tabla 8.** Análisis de Varianza (ANOVA) para el pH a las 72 horas.

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Tratamientos	15	0.0755	0.0050	2.523	0.0137
Residuos	32	0.0638	0.0019		

**Tabla 9.** Supuestos del modelo ANOVA para el pH a las 72 horas.

Independencia	Normalidad	Homogeneidad de varianzas
Prueba de Durbin-Watson DW = 1.69, Valor p = 0.446	Prueba de Shapiro-Wilk W = 0.983, Valor p = 0.726	Prueba de Levene Valor p = 0.7905

**Figura 3.** pH del ácido láctico evaluado a las 72 h de la fermentación. Tratamiento A (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento B (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento C (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento D (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento E (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento F (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento G (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 42 °C), Tratamiento H (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento I (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento J (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento K (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento L (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento M (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento N (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento O (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento P (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 42 °C). Los resultados son expresados como promedio del pH  $\pm$  DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren al 5%, de acuerdo con la prueba de DSH de Tukey.



En base al análisis estadístico ANOVA se observó el promedio del pH del ácido láctico evaluado a las 72 h de fermentación, para los tratamientos D y L el pH fue 2,37 para ambos. El ANOVA mostró

diferencia significativa entre los tratamientos (valor  $P = 0,0137$ ). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo (independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas). Los dos tratamientos antes mencionados lograron el mayor pH con las siguientes condiciones BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C y BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C, respectivamente.

## ANÁLISIS DEL pH A LAS 96 HORAS

Los datos considerados fueron:

**Tabla 10.** Resultados obtenidos de la medición del pH a las 96 horas de la fermentación

Tratamientos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
A	2,35	2,34	2,30
B	2,26	2,34	2,17
C	2,33	2,34	2,35
D	2,67	2,54	2,51
E	2,35	2,31	2,30
F	2,31	2,32	2,36
G	2,34	2,2,35	2,33
H	2,32	2,30	2,31
I	2,29	2,28	2,36
J	2,33	2,35	2,31
K	2,37	2,31	2,33
L	2,39	2,35	2,33
M	2,29	2,21	2,31
N	2,40	2,34	2,33
O	2,33	2,31	2,28
P	2,32	2,30	2,27

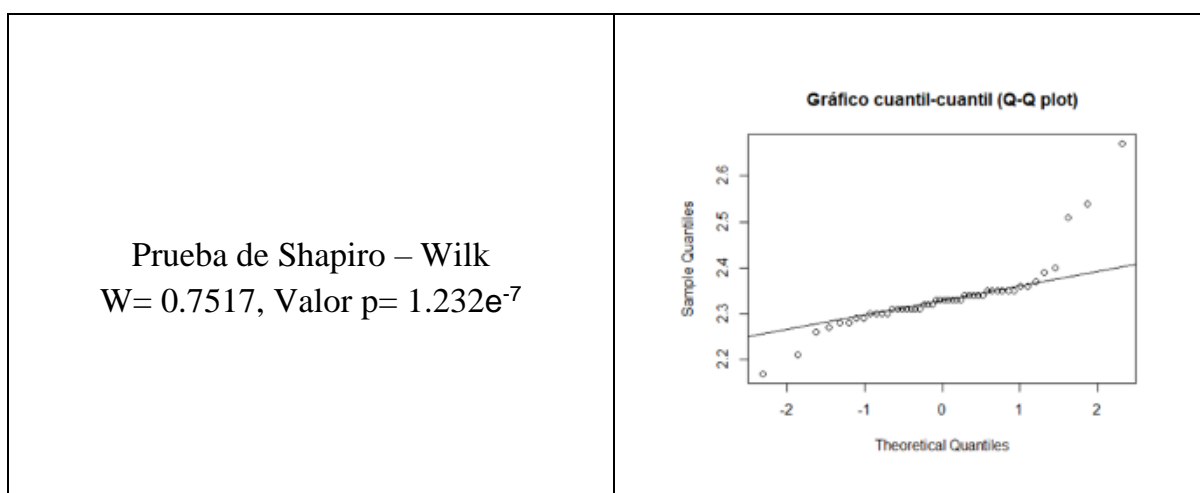
### Evaluación de la distribución normal de los datos

**Hipótesis nula:** los datos presentan distribución normal

**Hipótesis alternativa:** los datos no presentan distribución normal



Considerando el juego de hipótesis se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P < \alpha$ ), por ende, se puede decir que los datos no presentaron una distribución normal. Dichos resultados se evidenciaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk **Valor p =  $1.232e^{-7}$**  y el gráfico Cuartil-Cuartil los datos se ubicaron de forma aleatoria en relación a la línea de referencia y no siguen ninguna tendencia.



### Evaluación de la prueba rangos de Kruskal-Wallis

**Hipótesis nula:** los tratamientos no presentan diferencia significativa

**Hipótesis alternativa:** los tratamientos presentan diferencia significativa

Considerando el juego de hipótesis, se acepta la hipótesis nula (valor  $P < \alpha$ ), **Valor p=0.045**

<b>Kruskal-wallis chi-cuadrada= 25.327</b>	<b>gL= 15</b>	<b>Valor p=0.045</b>
--	---------------	----------------------

Los rangos medios del pH del ácido láctico evaluados a las 96 h en los diferentes tratamientos no difieren significativamente, el tratamiento D presenta el mayor valor de rango medio, siendo este 47. Si se relaciona directamente con el promedio del valor del pH para este tratamiento corresponde a 2,57. En este contexto, las condiciones experimentales para este tratamiento fueron: método (BAL en caldo nutritivo), sustrato (lactosuero desproteinizado y con suplementos), temperatura 37 °C (Tabla 1).

**Tabla 1: Valores de pH del ácido láctico evaluado a las 96 h**

Tratamientos	Promedio pH	Rangos medios	Grupos
D	2.573	47.00	a
L	2.356	35.83	a
N	2.356	34.33	a
C	2.340	31.83	a
G	2.340	31.83	a
K	2.336	28.33	a
A	2.330	26.67	a
J	2.330	26.50	a
F	2.330	26.17	a
E	2.320	21.33	a
I	2.310	18.17	a
H	2.310	15.83	a
O	2.306	15.83	a
B	2.256	12.00	a
P	2.296	11.83	a
M	2.27	8.50	a

Tratamiento A (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento B (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento C (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteinizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento D (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento E (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento F (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento G (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteinizar y con suplementos, 42 °C), Tratamiento H (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento I (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento J (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento K (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento L (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento M (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento N (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento O (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y con suplementos, 42 °C), Tratamiento P (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 42 °C). Los resultados son expresados en rangos medios, n = 3. Tratamientos con una letra común no difieren a un nivel de 5%, de acuerdo el método de ajuste de Holm.

### ANÁLISIS ACIDEZ 72 y 96 horas

**Tabla 11.** Resultados obtenidos del ANÁLISIS ACIDEZ 72 y 96 horas

Tratamientos	acidez
K72h	21.06
K72h	20.77
K72h	20.97
O72h	20.13
O72h	19.63
O72h	20.51
K96h	21.45
K96h	21.08
K96h	21.68
O96h	20.66
O96h	20.09
O96h	21.21

Evaluación de

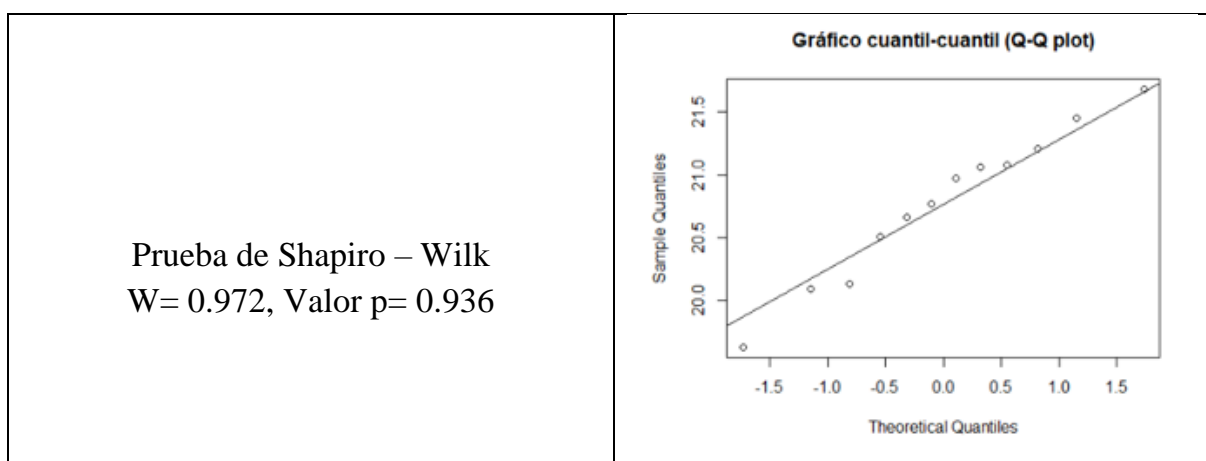
la distribución normal de los datos

**Hipótesis nula:** los

datos presentan distribución normal

**Hipótesis alternativa:** los datos no presentan distribución normal

Considerando el juego de hipótesis se acepta la hipótesis nula (valor  $P > \alpha$ ), por ende, se puede decir que los datos presentaron una distribución normal. Dichos resultados se evidenciaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk Valor  $p = 0.936$  y el gráfico Cuartil-Cuartil los datos se ubicaron de forma aleatoria en relación a la línea de referencia y no siguen ninguna tendencia.



- Evaluación del modelo ANOVA

**Hipótesis nula:** los tratamientos no presentan diferencia significativa

**Hipótesis alternativa:** los tratamientos presentan diferencia significativa

Considerando el juego de hipótesis, se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P < \alpha$ ), por ende, se puede decir que existe al menos un par de tratamiento que difieren entre si (**valor P = 0.02**) (Tabla 11).

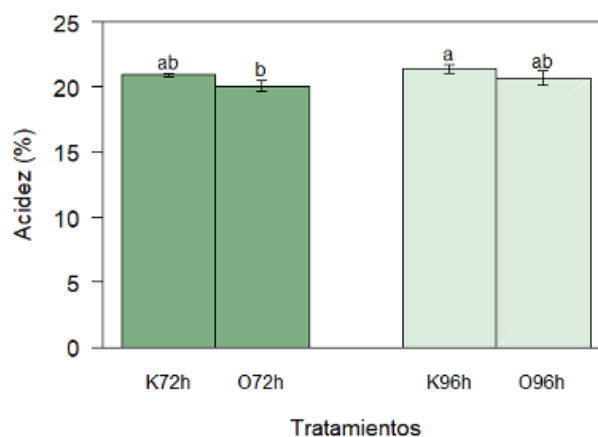
Análisis de Varianza (ANOVA) para la acidez a las 72 y 96 horas.

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Tratamientos	3	2.71	0.90	5.81	0.02
Residuos	8	1.24	0.15		

**Tabla 12.** Supuestos del modelo ANOVA para la acidez a las 72 y 96 horas.

<b>Independencia</b>	<b>Normalidad</b>	<b>Homogeneidad de varianzas</b>
Prueba de Durbin-Watson DW = 2.76, Valor p = 0.60	Prueba de Shapiro-Wilk W = 0.96, Valor p = 0.86	Prueba de Levene Valor p = 0.53

**Figura 4.** Acidez del ácido láctico evaluado a las 72 y 96 h de la fermentación. Tratamiento K (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento O (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 42 °C). Los resultados son expresados como promedio del porcentaje de acidez (%)  $\pm$  DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren al 5%, de acuerdo con la prueba de DSH de Tukey



Se observó mediante el análisis estadístico ANOVA el promedio de la acidez del ácido láctico evaluado a las 72 y 96 h de fermentación, para el tratamiento K96h la acidez fue 21,40 (%). El ANOVA mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor  $P = 0,0208$ ). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo (independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas). El tratamiento antes mencionado logró la mayor acidez con las siguientes condiciones BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y con suplementos, 37 °C evaluado a las 96 h.

### ANÁLISIS pH 72 y 96 horas

**Tabla 11.** Resultados obtenidos del pH a las 72 y 96 horas

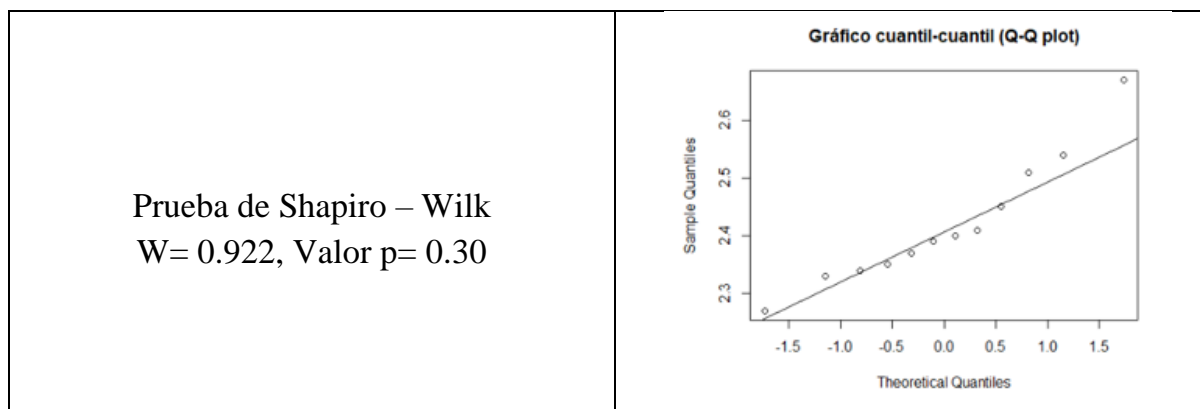
Tratamientos	Ph	
D72h	2.45	<b>Evaluación de la distribución normal de los datos</b>
D72h	2.4	
D72h	2.27	
L72h	2.41	
L72h	2.37	
L72h	2.34	
D96h	2.67	
D96h	2.54	
D96h	2.51	
L96h	2.39	
L96h	2.35	
L96h	2.33	

**Hipótesis nula:** los datos presentan distribución normal

**Hipótesis alternativa:** los datos no presentan distribución normal

Considerando el juego de hipótesis se acepta la hipótesis nula (valor  $P > \alpha$ ), por ende, se puede decir que los datos presentaron una distribución normal. Dichos resultados se evidenciaron

mediante la prueba de Shapiro-Wilk **Valor p = 0.30** y el gráfico Cuartil-Cuartil los datos se ubicaron de forma aleatoria en relación a la línea de referencia y no siguen ninguna tendencia



#### - Evaluación del modelo ANOVA

**Hipótesis nula:** los tratamientos no presentan diferencia significativa

**Hipótesis alternativa:** los tratamientos presentan diferencia significativa

Considerando el juego de hipótesis, se rechaza la hipótesis nula, se acepta la hipótesis alternativa (valor  $P < \alpha$ ), por ende, se puede decir que existe al menos un par de tratamiento que difieren entre si (valor  $P = 0.01$ ) (Tabla 12).

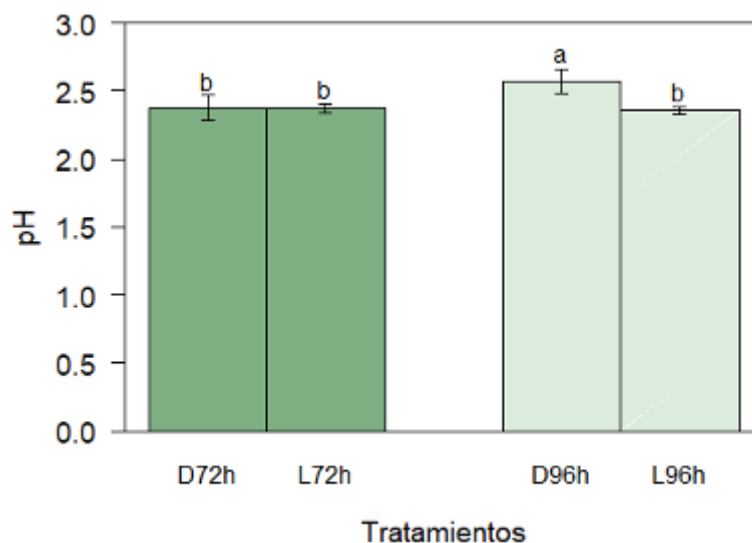
Análisis de Varianza (ANOVA) para el pH a las 72 y 96 horas.

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Tratamientos	3	0.09	0.04	7.07	0.01
Residuos	8	10.03	0.004		

**Tabla 13.** Supuestos del modelo ANOVA para el pH a las 72 y 96 horas.

<b>Independencia</b>	<b>Normalidad</b>	<b>Homogeneidad de varianzas</b>
Prueba de Durbin-Watson DW = 2.42, Valor p = 0.84	Prueba de Shapiro-Wilk W = 0.98, Valor p = 0.98	Prueba de Levene Valor p = 0.68

**Figura 5.** pH del ácido láctico evaluado a las 72 y 96 h de la fermentación. Tratamiento D (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos), Tratamiento L (BAL en lactosuero, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C). Los resultados son expresados como promedio del porcentaje de acidez (%)  $\pm$  DS, n = 3. Tratamientos con una letra en común no difieren al 5%, de acuerdo con la prueba de DSH de Tukey.



Se observó el promedio del pH del ácido láctico evaluado a las 72 h y 96 h de fermentación, para el tratamiento D96h el pH fue 2,57. El ANOVA mostró diferencia significativa entre los tratamientos (valor P = 0,0122). No se presentaron desviaciones severas a los supuestos del modelo (independencia, normalidad y homogeneidad de varianzas). El tratamiento antes mencionado logró el mayor pH con las siguientes condiciones BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos evaluado a las 96 h.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

- Se determinó que los parámetros fisicoquímicos del lactosuero presentaron valores de pH de 6,20 - 6,68, y de acidez: 0,17 - 0,35, los cuales son establecidos como favorables por la Norma INEN 2594: 2011. Requerimientos necesarios en los cuales las bacterias ácido lácticas pueden llevar a cabo las rutas metabólicas en la vía fermentativa para la producción de ácido láctico.
- Se obtuvo ácido láctico bajo las condiciones del proceso fermentativo mismas que influyeron en la obtención del ácido láctico, cumpliendo así con el objetivo e hipótesis establecida en esta investigación, utilizando las cepas BAL, de acuerdo a los resultados más relevantes de la presente investigación, para obtener "mayor producción" de ácido láctico se requirió que el lactosuero este desproteinizado y suplementado con extracto de levadura y Fosfato de amonio, se incubó a una temperatura de 37°C y se evaluó su producción a las 96 h, con este tiempo se obtuvo un incremento mayor de las bacterias, además, el método BAL en lactosuero es una condición favorable en este proceso. Se comprobó su eficacia mediante análisis fisicoquímicos, como es el de pH y acidez.
- A través de la cuantificación del porcentaje de acidez y pH expresado como ácido láctico, se comprobó que el enriquecimiento del medio con extracto de levadura y fosfato de amonio, así como también la desproteización del lactosuero, favorecieron en la actividad metabólica y crecimiento durante la fermentación de las bacterias ácido lácticas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y



*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, generando un mayor rendimiento para la producción de ácido láctico, se presentó a las 96 horas . El proceso de fermentación sucedió a 37°C con un pH inicial de 6. Los valores de % de acidez titulable de 2,31 a 6,91%.

- Se verificó la eficacia del proceso propuesto mediante FTIR, dando espectros similares a los del ácido láctico comercial. En los espectros comparados con la curva de ácido láctico comercial y los espectros obtenidos en el proceso, evidencian la presencia de ácido láctico con sus grupos funcionales, se evidenció bandas elevadas a 3489 y 2998  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al OH, banda a 2948  $\text{cm}^{-1}$  tensión del  $\text{CH}_3$ , 1735 y 1129  $\text{cm}^{-1}$  tensión de enlaces C=O y C=O, mismas que pertenecen al ácido láctico.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar con lactosuero fresco con un pH de 6 a 6,5 así como lo detalla la Norma INEN, para así evitar acidificación, descomposición o contaminación del lactosuero. El tiempo máximo de vida útil del lactosuero en refrigeración es de 5 días.

- Se propone realizar controles exhaustivos del proceso en sí, para así evitar contaminaciones, ya que estos son sensibles y susceptibles a ser atacados por virus u hongos que pueden presentarse a su alrededor, esto conlleva la muerte de las bacterias y una pérdida en el proceso.
- Se recomienda sembrar las bacterias en lactosuero, o en leche, ya que esto favorece su crecimiento y propagación, al ser bacterias ácido lácticas este medio les brinda un medio rico en nutrientes, y se puede obtener mayor porcentaje de ácido láctico. Este medio aparte de ser efectivo es de bajo costo y su obtención es fácil.
- Se recomienda trabajar con materiales completamente esterilizados, en zonas asépticas para evitar contaminaciones. Así también se propone que los medios, preparación de inóculos se hagan con un día de anticipación, no se recomienda almacenar los medios o los sustratos por un tiempo prolongado ya que pierden efectividad, se busca conservar en su mayoría sus nutrientes para favorecer el proceso.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Agualongo, N., Tisalema, S., & Lema, J. (2019). Análisis económico sobre la sobreproducción de leche en Ecuador. 8-16. 10.56519/rci.v3i5.51

Aucatoma, D., & Sagnay, D. (2022, Mar 28). Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry: Composition, protein recovery and applications. *Journal of agro-industry sciences*, Vol. 4(Iss: 1), 13-22. 10.17268/jais.2022.002

Barrera Rodríguez, C. D. (2021, Junio). *Análisis de la productividad, rentabilidad y sostenibilidad de los productos de leche cruda en el cantón Píllaro, provincia de Tungurahua*. FLACSO Ecuador.

<https://repositorio.flacsoandes.edu.ec/bitstream/10469/17503/2/TFLACSO-2021CDBR.pdf>

Calvopiña, C., & Betancourt, J. (2020). *Obtención de ácido láctico a partir de lactosuero y almidón de papa mediante fermentación láctica*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA.

<https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2cf8cc23-1990-4e9d-8a77-a88f4d588365/content>

Dosuky, A. (2022, February 11). Isolation, identification, and application of lactic acid-producing bacteria using salted cheese whey substrate and immobilized cells technology. *SpringerOpen*, (26), 20, 26. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00316-5>

Gálvez Cadena, E. (2022). *Obtención de ácido láctico a partir de lactosuero suplementado utilizando lactobacillus casei mediante fermentación continua*.

Universidad Técnica del Norte. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/11903>

García, C. (2010). Producción de ácido láctico por vía Biotecnológica. *Temas Agrarios*, 9-26. <https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>

González, M., Castells, M., & Colaboradores. (2017). *Valorización del Lactosuero*. INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial. <https://www.inti.gob.ar/publicaciones/descargac/16>

Guevara Viera, Torres, I., & Ceró, E. (2022, Oct 24). Efecto de la pandemia del Covid-19 sobre la producción de leche por hectárea en los rebaños ecuatorianos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, Vol. 30(Sup. 2), 95-97. [https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs\\_files/article/view/3102](https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/3102)

*Industria Láctea en Ecuador MAGAP*. (2019, November 9). MAGAP. Retrieved February 12, 2024, from <https://www.agricultura.gob.ec/?s=industria+lactea>

INEN 2594, N. (2011). *Suero de leche líquido*. <https://ia801900.us.archive.org/17/items/ec.nte.2594.2011/ec.nte.2594.2011.pdf>

Ionita, E. (2022, 06 13). La producción de leche en Ecuador. *Veterinaria Digital*. <https://www.veterinariadigital.com/articulos/la-produccion-de-leche-en-ecuador/>

Lema Guamán, J. (2023). *APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LA LECHE PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO FACULTAD DE INGENIERÍA CARRERA DE INGENIERÍA

AGROINDUSTRIAL.

<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/10593/1/Lema%20Jaime%20%282023%29%20Aprovechamiento%20del%20suero%20de%20la%20leche%20para%20la%20obteni%c3%b3n%20de%20%20c3%a1cido%20l%20c3%a1ctico..pdf>

Lima de Jesus, L., Drumond, M., & colaboradores. (2021, Apr. 14). Probiogenomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133: In Silico, In Vitro, and In Vivo Approaches. *National Library of Medicine*. 10.3390/microorganisms9040829.

O'Donoghue, L. T., & Murphy, E. G. (2023, April 17). Non Dairy food applications of whey and milk permeates: Direct and indirect uses. *IFT feeding the minds that feed the world.*, Vol. 22, 2652-2677. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13157>

Ortega, D. A. (2020, Agosto 28). Enfoque de la Biotecnología Industrial en Ecuador y la provincia de Esmeraldas. *Polo del Conocimiento, Volumen 5*(No 08), 12. 10.23857/pc.v5i8.1655

Patel, S. A. (2016, Mayo 10). *Production of Lactic Acid from Whey by Lactobacillus sp. Isolated from Local Dairy Products*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. <https://www.ijcmas.com/5-5-2016/Sweta%20A.%20Patel%20and%20Samir%20C.%20Parikh.pdf>

S., P., S, K., & Colaboradores. (2022, March 14). Utilization of whey in bakery products-A Review. *Indian Journal of Dairy Science*, Vol. 75(No. 4). <https://epubs.icar.org.in/index.php/IJDS/article/view/101108>

Salazar, C., & Alisson Andrea. (2022). *Beneficios de la utilización del suero de leche en la elaboración de suplementos proteicos en la industria láctea*. Universidad Central del Ecuador.

<https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/441fd815-2236-44e6-a067-1db9de87b64a/content>

UTPL. (2021). *Suero de leche un aliado para la Innovación Alimentaria*. UTPL

BLOG. <https://noticias.utpl.edu.ec/suero-de-leche-un-aliado-para-la-innovacion-alimenticia#:~:text=En%20Ecuador%2C%20se%20generan%20cerca,fines%20comerc>  
[c](#)

Valdés Rayo, A., Castro, M., & Susana Patricia. (2018). *Producción de ácido láctico por vía fermentativa a partir de lactosuero producido por la FESC*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

[https://repositorio.unam.mx/contenidos/produccion-de-acido-lactico-por-via-fermentativa-a-partir-de-lactosuero-producido-por-la-fesc-360758?c=YYakNz&d=false&q=\\*&i=2&v=1&t=search\\_0&as=0](https://repositorio.unam.mx/contenidos/produccion-de-acido-lactico-por-via-fermentativa-a-partir-de-lactosuero-producido-por-la-fesc-360758?c=YYakNz&d=false&q=*&i=2&v=1&t=search_0&as=0)

Valdez, M., & Pachapur, V. (2020, Jul 21). Yeast-driven whey biorefining to produce value-added aroma, flavor, and antioxidant compounds: technologies, challenges, and alternatives. *Taylor y Francis Online*, 930-950.

<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1792407>

*La producción de leche en Ecuador.* (2022, June 13). Veterinaria Digital - Avicultura, Porcicultura, Rumiantes Y Acuicultura. <https://www.veterinariadigital.com/articulos/la-produccion-de-leche-en-ecuador/>

Medrano, S. A. (2023, March 30). *Industria lechera ecuatoriana cumple con altos estándares de calidad e inocuidad.* www.vistazo.com. <https://www.vistazo.com/enfoque/industria-lechera-ecuatoriana-cumple-con-altos-estandares-de-calidad-e-inocuidad-JG4811209>

Parikh, S. A. (2016). Production of Lactic Acid from Whey by *Lactobacillus* sp. Isolated from Local Dairy Products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* , 734-735.

Miguel Mazorra, J. M. (03 de Agosto de 2020). *Properties and options for the valorization of whey from the artisanal cheese industry.* Obtenido de SciELO: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-7858201900020013](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-7858201900020013)

Robalino, J. (junio de 2017). Obtención de ácido láctico a partir del lactosuero mediante un proceso biofermentativo utilizando un cultivo mesófilo homofermentativo. *Proyecto previo a la obtención del título de ingeniero agroindustrial* . Quito .

Sonia Soriano, L. F. (05 de mayo de 2011). Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*.

Rodríguez-Guerra, A., & Martínez, F. S. (2020, December 18). *Responsabilidad social y gestión ambiental del agua, solución en la industria de lácteos de Ecuador*. Alfa. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v4i12.85>

Muñoz, E., Andriamandroso, A., Blaise, Y., Ron, L., Montufar, C., Kinkela, P. M., Lebeau, F., & Bindelle, J. (2020, November 1). *How do management practices and farm structure impact productive performances of dairy cattle in the province of Pichincha, Ecuador*. DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals). <https://doi.org/10.17170/kobra-202010191971>

Mayorga, D. F. B. (2022). *Modelación matemática para el control de temperatura de salida en tanques de almacenamiento térmico de la Industria láctea*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Modelaci%C3%B3n-matem%C3%A1tica-para-el-control-de-de-salida-Mayorga-Avalos/eac89a28e793e229cb5ca2223391e8f46fba1468>

Cevallos, E. P. V., Ayala, D. B., & Zapata, T. G. (2016, December 23). *Modelo de implementación del Sistema de Gestión de la Prevención de Riesgos Laborales en una industria láctea de Riobamba- Ecuador*. Industrial Data. <https://doi.org/10.15381/idata.v19i2.12817>



López, R. (2019). *Diseño de un laboratorio de investigación, desarrollo e innovación para la industria láctea de la zona 1 del Ecuador.*

<https://www.semanticscholar.org/paper/Dise%C3%B1o-de-un-laboratorio-de-investigaci%C3%B3n-2C-e-para-1-L%C3%B3pez-Andr%C3%A9/9f16dd095e93ab04a28898ee3d1f4b9c25a254bf>

De Paiva Anciens Ramos, G. L., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., Da Cruz, A. G., De Souza, S. L. Q., & Vendramel, S. M. R. (2021, January 1). *Whey: generation, recovery, and use of a relevant by-product.* Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824044-1.00030-1>

Srinath, D. (2017, October 30). *Uses of Whey: A Review.* International Journal of Pure and Applied Bioscience. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.5435>

Gorachiya, P. R., Bais, B., Kumar, D., Sant, B., & Singh, S. (2018, September 10). *Study of Formulation, Sensory Evaluation and Microbiological Study of Whey Beverage from Camel and Buffalo Milk.* International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.709.328>

Torres, J. L. (2021, April 7). *Cuatro características del lactosuero que la industria y los consumidores deben tener en cuenta.* Naturall Group. <https://www.naturallgroup.com/post/lactosuerocharacter%C3%ADsticas>

Fabregas, J. (2024, January 18). *Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea*; Sigmadaf. Sigmadaf. <https://sigmadafclarifiers.com/tratamiento-de-aguas-residuales-de-la-industria-lactea/>

A. (2018, August 22). *Tratamiento de Aguas Residuales en la Industria Láctea - SPENA GROUP Tratamiento de Aguas Residuales.* SPENA GROUP Tratamiento De Aguas Residuales. <https://spenagroup.com/tratamiento-aguas-residuales-la-industria-lactea/>

Ceo, S. T. (2023, April 18). *Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea* / Condorchem Enviro Solutions. Condorchem Enviro Solutions. <https://condorchem.com/es/blog/tratamiento-de-aguas-residuales-de-la-industria-lactea/>

Flowen, E. (2022, June 15). *Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea.* Flowen. <https://flowen.com.pe/industria-lactea-2/>

Murata, M. M., Da Silva Marques, J. B., Morioka, L. R. I., & Suguimoto, H. H. (2023, March 27). *Applications of Cheese Whey in Dairy Production Chains.* Advances in Logistics,

Operations, and Management Science Book Series. <https://doi.org/10.4018/978-1-6684-5472-5.ch010>

Zandona, S. (2021, April 20). *Whey Utilization: Sustainable Uses and Environmental Approach*. Retrieved February 16, 2024, from <https://www.ftb.com.hr/archives/1713-whey-utilization-sustainable-uses-and-environmental-approach>

Poonia, A., & Pandey, S. (2022, May 20). *Production of microbial pigments from whey and their applications: a review*. Nutrition & Food Science. <https://doi.org/10.1108/nfs-02-2022-0055>

Requena, T. (2019, November 18). *Bacterias lácticas en la alimentación y en la salud*. DIGITAL.CSIC. <https://digital.csic.es/handle/10261/194782>

R, T. S., Trabazo, L. T., & colaboradores. (2006, August 30). Productos lácteos fermentados. *Anales de Pediatría*. <https://www.analesdepediatria.org/es-productos-lacteos-fermentados-articulo-13092366>

L, P. Q. (2006, August 30). *Probióticos: situación actual y líneas de investigación*. Anales de Pediatría. <https://www.analesdepediatria.org/es-probioticos-situacion-actual-lineas-investigacion-articulo-13092365>

Olveira, G., & González-Molero, I. (2016, November 1). *Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica*. *Endocrinología Y Nutrición*. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>

Edith, K., Rocha, K. E. M., Universidad, S., & De Biotecnología Medellín, P. (2018, March 18). *POTENCIAL TECNOLÓGICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL SUERO COSTEÑO (CREMA ÁCIDA DE LECHE) DE LOS. . .* ResearchGate. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21426.63688>

Anadón, A., Arés, I., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2021, January 1). *Probiotics: safety and toxicity considerations*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821038-3.00065-3>

Requena, T. (2019, November 18). *Bacterias lácticas en la alimentación y en la salud*. DIGITAL.CSIC. <https://digital.csic.es/handle/10261/194782>

Anadón, A., Arés, I., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2021, January 1). *Probiotics: safety and toxicity considerations*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821038-3.00065-3>

Kafsi, H. E., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J., Boudebbouze, S., Dervyn, R., Kennedy, S. P., Galleron, N., Quinquis, B., Batto, J. M., Moumen, B., Maguin, E., & Van De Guchte, M. (2014, May 28). *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis and ssp. Bulgaricus: a chronicle of evolution in action*. BMC Genomics. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-407>

Pintado-Vallejo, P. J., Sarabia, D., Matute-Heredia, F. J., & Guevara, D. S. (2018, March 31). *UTILIZACIÓN DE TRES NIVELES DE LACTOSUERO EN LA ELABORACIÓN DE MANJAR DE LECHE, EN ECUADOR*. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/publication/325723332\\_UTILIZACION\\_DE\\_TRES\\_NIVELES\\_DE\\_LACTOSUERO\\_EN\\_LA\\_ELABORACION\\_DE\\_MANJAR\\_DE\\_LECHE\\_EN\\_ECUADOR](https://www.researchgate.net/publication/325723332_UTILIZACION_DE_TRES_NIVELES_DE_LACTOSUERO_EN_LA_ELABORACION_DE_MANJAR_DE_LECHE_EN_ECUADOR)

Soille, S. (2019). *Un système de régulation de type quorum sensing de Streptococcus thermophilus actif en milieu solide et en matrice laitière*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Un-syst%C3%A8me-de-r%C3%A9gulation-de-type-quorum-sensing-de-Soille-Gardan/629de2a351416447122bcde7a842b42854639455>

De Jesus, L. C. L., De Jesus Sousa, T., Coelho-Rocha, N. D., Profeta, R., Barroso, F. A. L., Drumond, M. M., Mancha-Agresti, P., Ferreira, N., Brenig, B., Aburjaile, F. F., & Azevedo, V. (2021, August 17). *Safety Evaluation of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis CIDCA 133: a Health-Promoting Bacteria*. Probiotics and Antimicrobial Proteins. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09826-z>

Malaka, R. (2020). *Evaluación de la producción de exopolisacáridos de una cepa de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus en diferentes sustratos*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluaci%C3%B3n-de-la-producci%C3%B3n-de-exopolisac%C3%A1ridos-de-Malaka-Maruddin/ef34217d04a7793e6988ca4f3d5277f0f88e7bf1>

Palma, G. B. A. (2023). *APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO EN LA INDUSTRIA*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/APROVECHAMIENTO-DEL-LACTOSUERO-EN-LA-INDUSTRIA-Palma-Ter%C3%A1n/696212d4a33bc0436ffdd10fde56a9a910aca910>

Colmenares, A. P. A. (2023). *Review. Aplicaciones del lactosuero y sus derivados proteínicos*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Review.-Aplicaciones-del-lactosuero-y-sus-derivados-Colmenares-Su%C3%A1rez/44bcb1b63b53ddd58e07b86d3b6bd455ce454373>

Segovia-Hernández, J. G., Sánchez-Ramírez, E., Ramírez-Márquez, C., & Contreras-Zarazúa, G. (2022, January 1). *Lactic acid*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89870-6.00013-5>

Cedeño, A. (2020, January 16). *Ácido láctico: ¿Qué es?, para qué sirve, nombre comercial y más.* Conozcamos las Características De Cada Una De Las Medicinas. Retrieved February 16, 2024, from [https://farmaciainformativa.com/acido-lactico/#google\\_vignette](https://farmaciainformativa.com/acido-lactico/#google_vignette)

Guridi, P. D. (2019). *Nuevo proceso para la producción biotecnológica de ácido láctico: integración de tecnologías de filtración con membranas.* <https://www.semanticscholar.org/paper/Nuevo-proceso-para-la-producci%C3%B3n-biotecnol%C3%B3gica-de-Guridi/1dbe2086bf5dfefa75f610b6e7eeef84e7523a98>

Alzate, C. A. C. (2004). *Separación de ácido láctico por destilación reactiva.* <https://www.semanticscholar.org/paper/Separaci%C3%B3n-de-%C3%A1cido-l%C3%A1ctico-por-destilaci%C3%B3n-Alzate-Giraldo/64f26c53a9ff3fe76de6b54e61b6cc4633614584>

Palma, G. B. A. (2023). *APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO EN LA INDUSTRIA.* <https://www.semanticscholar.org/paper/APROVECHAMIENTO-DEL-LACTOSUERO-EN-LA-INDUSTRIA-Palma-Ter%C3%A1n/696212d4a33bc0436ffdd10fde56a9a910aca910>

## Anexo 1. Descripción del producto CHOOZIT 800

Danisco Cultures  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 1 / 3

**DANISCO**

First you add knowledge...

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 207216-3.0EN**

**Material no. 50573**

**CHOOZIT™ MY 800 LYO 5 DCU**

CHOOZIT™ Cheese Cultures

**Description**

Freeze-dried concentrated lactic starter for the direct vat inoculation of milk and milk bases.

**Usage levels**

Product	Dose
Fermented milk	20 DCU / 100 l of vat milk
Reblochon type	5 - 8 DCU / 100 l of vat milk
Specialties soft cheese, semi-hard cheese	5 - 8 DCU / 100 l of vat milk

Temperature: 42°C

The quantities of inoculation indicated should be considered as guidelines. Supplement cultures may be required depending on technology, fat content and product properties desired. We do not accept any liability in case of undue application.

**Directions for use**

Store at temperature < 4 °C in dry atmosphere. When stored at negative temperature, keep the sachet at room temperature for 30 to 60 minutes before opening. If not, the performance of the culture is affected. Prolonged exposure at room temperature will reduce performances. Check before use that the culture is in powder form. Add directly to the manufacturing milk as soon as the agitation blades of the vat are covered with milk. Avoid foam and air introduction in the milk.

Important recommendations:

If the product has formed a solid mass, it should be discarded. To keep bacteriophage contamination under control, ensure plant and equipments are cleaned and disinfected with appropriate products at regular intervals to limit bacteriophage concentration level. Avoid any system that brings back part of end products to the beginning of the processing line in order to limit phage propagation.

We do not accept any liability in case of undue application.

**Composition**

Streptococcus thermophilus  
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis  
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

**Properties**

- Freeze dried form facilitates the storage and handling of cultures.  
- CHOOZIT™ MY 800 LYO 5 DCU is a blend of selected strains for direct vat inoculation of manufacturing milk, they have been carefully chosen and combined to answer your specific needs in term of acidification, texture and taste.  
- Cultures in the CHOOZIT™ MY 800 LYO 5 DCU gives quick acidification to pH 4.70 - 4.60 and then, a slower acidification to reach lower pH. This characteristic allows a good pH control for a constant optimised quality product.

**Physical/chemical specifications**

**Quantitative/Activity standard**


Test medium:  
Sterilised reconstituted milk (12% solids)  
Heated 20 min at 110 °C. Standardised to pH 6.60

Temperature:	42 °C
Inoculation rate:	20 DCU / 100 l
Delta pH:	1.00
Time to reach the delta pH:	<= 3 hours

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.



## Anexo 2. Norma INEN 0013 Acidez titulable

CDU: 637.127.6		AL 03.01-303
<b>Norma Técnica Ecuatoriana</b>	<b>LECHE. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE</b>	<b>INEN 13</b> Primera Revisión
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p><b>1.1</b> Esta norma establece el método para determinar la acidez titulable de la leche.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. ALCANCE</b></p> <p><b>2.1</b> Esta norma se aplica a los siguientes tipos de leche:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Leche fresca.</li> <li>b) Leche homogenizada (pasteurizada o esterilizada).</li> <li>c) Leche descremada o semidescremada.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>3. TERMINOLOGIA</b></p> <p><b>3.1 Acidez titulable de la leche.</b> Es la acidez de la leche, expresada convencionalmente como contenido de ácido láctico, y determinada mediante procedimientos normalizados.</p> <p><b>3.2</b> Otros términos relacionados con esta norma se definen en la Norma INEN 3.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. RESUMEN</b></p> <p><b>4.1</b> Se titula la acidez con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador.</p> <p style="text-align: center;"><b>5. INSTRUMENTAL</b></p> <p><b>5.1 Balanza analítica.</b> Sensible al 0,1 mg.</p> <p><b>5.2 Matraz Erlenmeyer</b> de 100 cm<sup>3</sup>.</p> <p><b>5.3 Matraz aforado</b> de 500 cm<sup>3</sup>.</p> <p><b>5.4 Bureta</b> de 25 cm<sup>3</sup>, con divisiones de 0,05 cm<sup>3</sup> o de 0,1 cm<sup>3</sup>.</p> <p><b>5.5 Estufa</b>, con regulador de temperatura, ajustada a 103° ± 2°C.</p> <p><b>5.6 Desecador</b>, con cloruro de calcio anhidro u otro deshidratante adecuado</p>		

## 6. REACTIVOS

- 6.1 Solución 0,1 N de hidróxido de sodio**, debidamente estandarizada.
- 6.2 Solución indicadora de fenolftaleína.** Disolver 0,5 g de fenolftaleína en 100 cm<sup>3</sup> de alcohol etílico de 95 - 96 %(V/V).
- 6.3 Agua destilada**, exenta de CO<sub>2</sub> y fría.

## 7. PREPARACION DE LA MUESTRA

- 7.1** Llevar la muestra a una temperatura aproximada de 20°C y mezclarla mediante agitación suave hasta que esté homogénea, cuidando que no haya separación de grasa por efecto de la agitación.
- 7.2** Si se forman grumos de crema y éstos no se dispersan, calentar la muestra en baño María hasta 35° - 40°C, mezclando cuidadosamente e incorporando cualquier partícula de crema adherida al recipiente; enfriar rápidamente hasta 18° - 20°C. Si quedan partículas blancas o grumos de grasa adheridos a las paredes del recipiente, la determinación no dará resultados exactos.

## 8. PROCEDIMIENTO

- 8.1** La determinación realizar por duplicado sobre la misma muestra preparada.
- 8.2** Lavar cuidadosamente y secar el matraz Erlenmeyer en la estufa a 103° ± 2°C durante 30 min. Dejar enfriar en el desecador y pesar con aproximación al 0,1 mg.
- 8.3** Invertir, lentamente, tres o cuatro veces, la botella que contiene la muestra preparada; inmediatamente, transferir al matraz Erlenmeyer y pesar con aproximación al 0,1 mg, aproximadamente 20 g de muestra.
- 8.4** Diluir el contenido del matraz con un volumen dos veces mayor de agua destilada, y agregar 2 cm<sup>3</sup> de solución indicadora de fenolftaleína.
- 8.5** Agregar, lentamente y con agitación, la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, justamente hasta conseguir un color rosado persistente (fácilmente perceptible si se compara con una muestra de leche diluida de acuerdo con lo indicado en 8.4) que desaparece lentamente.
- 8.6** Continuar agregando la solución hasta que el color rosado persista durante 30 s.
- 8.7** Leer en la bureta el volumen de solución empleada, con aproximación a 0,05 cm<sup>3</sup>.

## 8. CALCULOS

9.1 La acidez titulable de la leche se calcula mediante la ecuación siguiente (ver nota 1).

$$A = 0,090 \frac{V \times N}{m_1 - m} \times 100$$

**Siendo:**

A = acidez titulable de la leche, en porcentaje en masa de ácido láctico (ver Anexo A).

V = volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, en cm<sup>3</sup>.

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

m = masa del matraz Erlenmeyer vacío, en g.

m<sub>1</sub> = masa del matraz Erlenmeyer con la leche, en g.

9.2 El porcentaje de acidez titulable debe calcularse con aproximación a milésimas.

### Anexo 3. Requisitos de la Norma INEN 2594

NTE INEN 2594

2011-08

#### 6. REQUISITOS

##### 6.1 Requisitos físicos y químicos

6.1.1 El suero de leche líquido, ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 1.

**TABLA 1. Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido**

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min.	Máx.	
Lactosa, % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (m/m) <sup>(1)</sup>	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0,7	--	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41

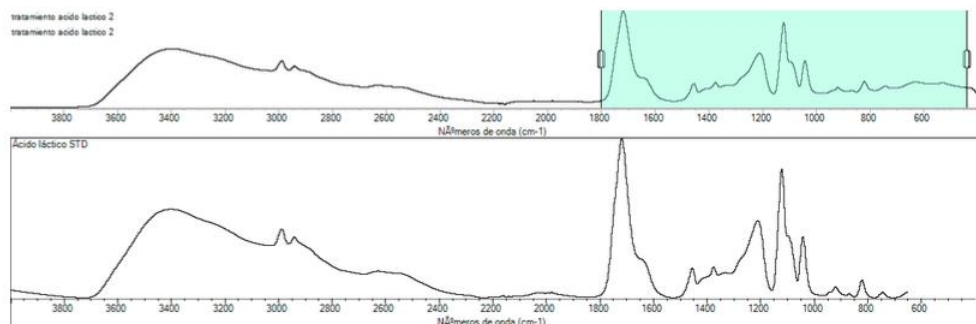
<sup>(1)</sup> el contenido de proteína láctea es igual a 6,38 por el % nitrógeno total determinado

#### Equipo de medición de pH



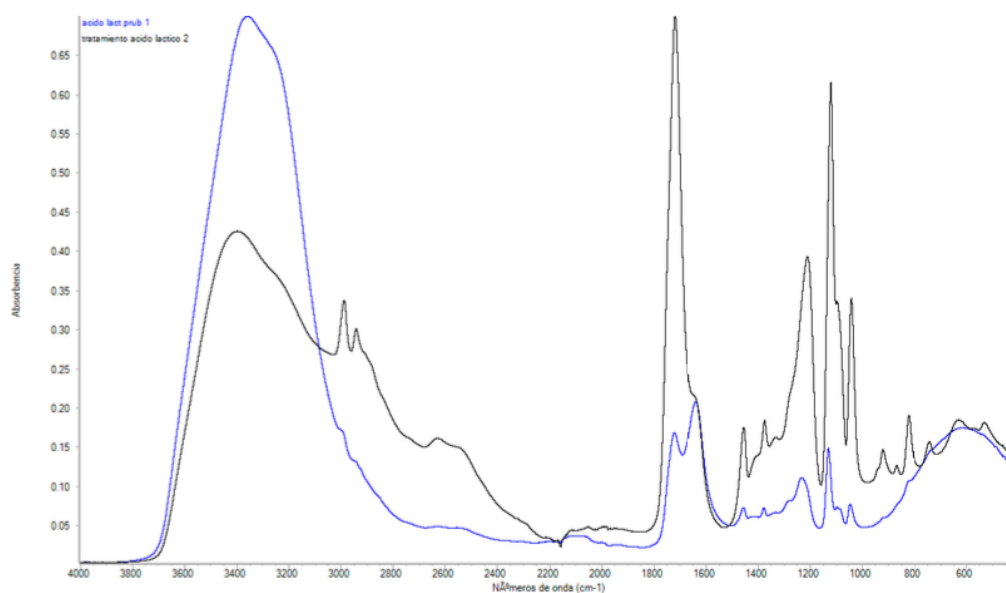
## Anexo 4. Reportes de los espectros obtenidos.

### Resultados de la búsqueda de espectro

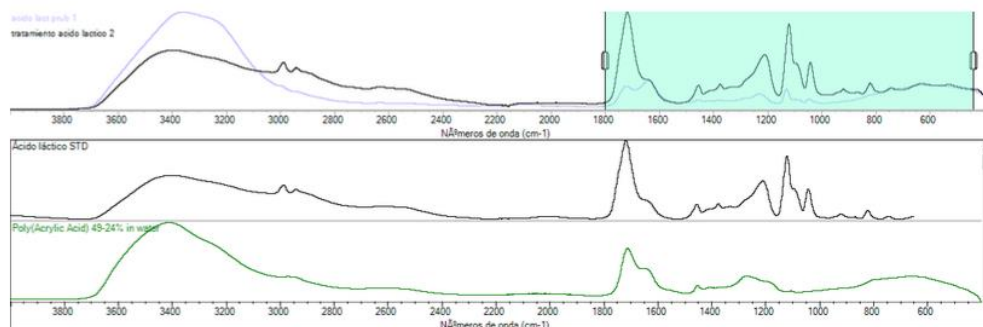


Coincidencia	Título	Rango	Carpeta:	Nombre de archivo	Índice	
1	99.92	Ácido láctico STD	1798.5-642.0	Ácido lactico	c:\my documents\omnic\libs\lact.lbd	1

### Resultados del espectro



## Resultados de la búsqueda de espectro



	Coincidencia	Título	Rango	Carpeta:	Nombre de archivo	Índice
1	99.92	Ácido láctico STD	1798.5-642.0	Ácido lactico	c:\my documents\omnic\libs\lact.lbd	1
2	49.31	Poly(Acrylic Acid) 49-24% in water	1798.5-440.5	HR Spectra Polymers and Plasticizers by ATR - corrected	c:\my documents\omnic\libs\sea465.lbd	114

## Análisis estadísticos

## ANEXO 5. Acidez 42 °C a 72 horas

Datos recopilados en las tablas de EXCEL de medios de cultivo, pH, acidez, Temperaturas y tiempos.

**Figura 1.** Matriz original de datos.

	A	B	C	D	E
1	ttos	Metodos	Sustrato	Temperatura	Hora
2	A	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	37	72
3	B	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	37	72
4	C	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos	37	72
5	D	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	37	72
6					
7	E	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	42	72
8	F	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	42	72
9	G	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos	42	72
10	H	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	42	72
11					
12	I	BAL en lactosuero	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	37	72
13	J	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	37	72
14	K	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	37	72
15	L	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	37	72
16					
17	M	BAL en lactosuero	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	42	72
18	N	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	42	72
19	O	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	42	72
20	P	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	42	72

G	H	I	J	K
ttos	Metodos	Sustrato	Temperatura	Hora
A	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	37	96
B	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	37	96
C	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos	37	96
D	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	37	96
E	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	42	96
F	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	42	96
G	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos	42	96
H	BAL en caldo nutritivo	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	42	96
I	BAL en lactosuero	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	37	96
J	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	37	96
K	BAL en lactosuero	Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos	37	96
L	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	37	96
M	BAL en lactosuero	Lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos	42	96
N	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y sin suplementos	42	96
O	BAL en lactosuero	Lactosuero sin desproteínizar y con suplementos	42	96
P	BAL en lactosuero	Lactosuero desproteínizado y con suplementos	42	96

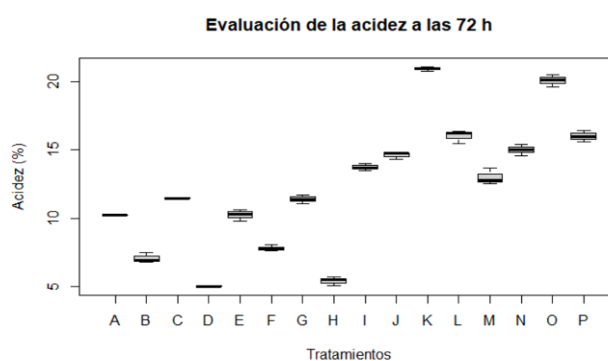
**Figura 1.** Acidez del ácido láctico evaluado a las 72 h de la fermentación. Tratamiento A (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento B (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento C (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteínizar y con suplementos, 37 °C), Tratamiento D (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteínizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento E (BAL en caldo nutritivo,

lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento F (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento G (BAL en caldo nutritivo, lactosuero sin desproteinizar y con suplementos, 42 °C), Tratamiento H (BAL en caldo nutritivo, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento I (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento J (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 37 °C), Tratamiento K (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento L (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 37 °C), Tratamiento M (BAL en lactosuero, lactosuero sin desproteinizar y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento N (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y sin suplementos, 42 °C), Tratamiento O (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 42 °C), Tratamiento P (BAL en lactosuero, lactosuero desproteinizado y con suplementos, 42 °C).

### Acidez 42°C:

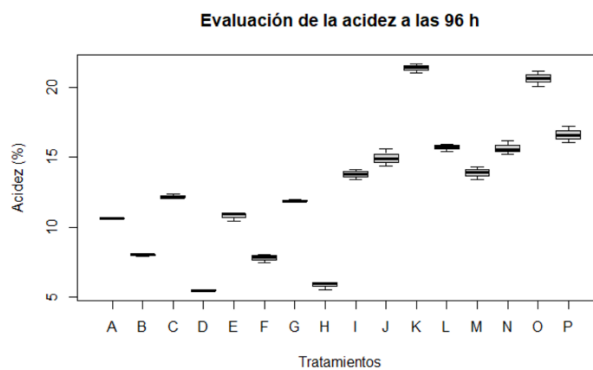
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	K72h	O72h	K96h	O96h	D72h	L72h	D96h	L96h
2	21,06	20,13	21,45	20,66	2,45	2,41	2,67	2,39
3	20,77	19,63	21,08	20,09	2,4	2,37	2,54	2,35
4	20,97	20,51	21,68	21,21	2,27	2,34	2,51	2,33

### DIAGRAMA DE CAJA Y BIGOTES:



### Diagrama de caja y bigotes



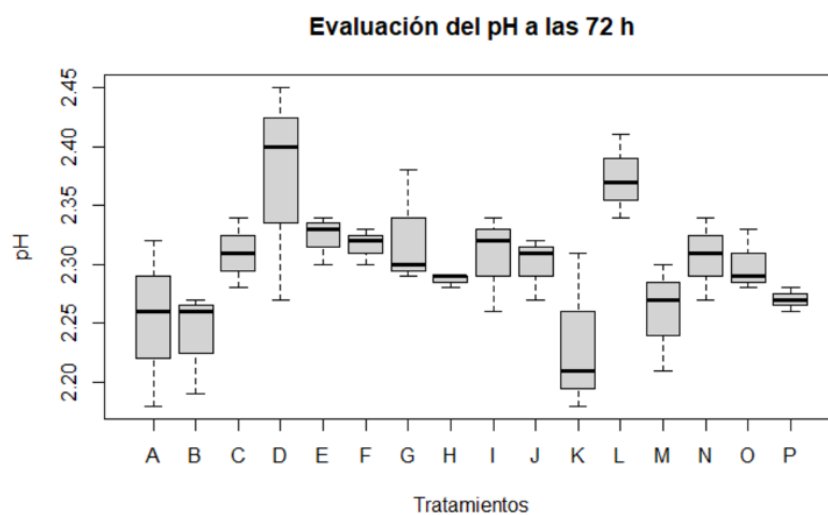


### Anexo 9: ANÁLISIS pH 72 horas

ttos	pH72h
A	2.18
B	2.19
C	2.28
D	2.45
E	2.33
F	2.3
G	2.3
H	2.29
I	2.26
J	2.27
K	2.31
L	2.41
M	2.27
N	2.31
O	2.28
P	2.27
A	2.26
B	2.27
C	2.34
D	2.4
E	2.34
F	2.33
G	2.38
H	2.28
I	2.34
J	2.31
K	2.21
L	2.37
M	2.21
N	2.34
O	2.29

P	2.26
A	2.32
B	2.26
C	2.31
D	2.27
E	2.3
F	2.32
G	2.29
H	2.29
I	2.32
J	2.32
K	2.18
L	2.34
M	2.3
N	2.27
O	2.33
P	2.28

### Diagrama de caja y bigotes

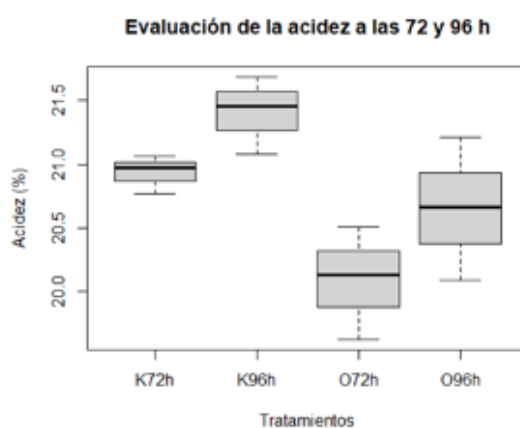


### Anexo.10 ANÁLISIS ACIDEZ 72 y 96 horas

ttos	acidez
K72h	21.06
K72h	20.77
K72h	20.97

O72h	20.13
O72h	19.63
O72h	20.51
K96h	21.45
K96h	21.08
K96h	21.68
O96h	20.66
O96h	20.09
O96h	21.21

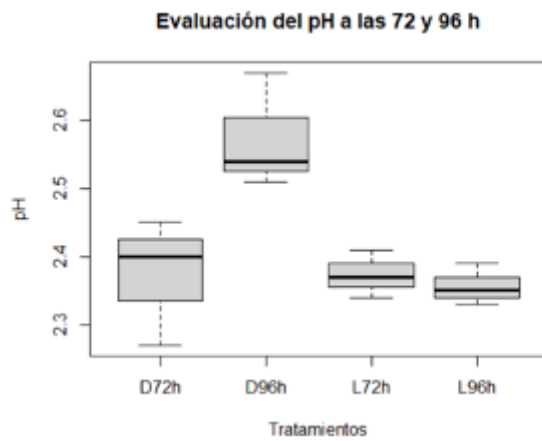
### Diagrama de caja y bigotes



### ANEXO 10. ANÁLISIS pH 72 y 96 horas

Tratamientos	Ph
D72h	2.45
D72h	2.4
D72h	2.27
L72h	2.41
L72h	2.37
L72h	2.34
D96h	2.67
D96h	2.54
D96h	2.51
L96h	2.39
L96h	2.35
L96h	2.33

### Diagrama de caja y bigotes



**ANEXO M****PROCEDIMIENTO COMPLETO DE LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO****ANEXO 1. Pasteurización del lactosuero****A: Pasteurización****B: Centrifugación****C: Filtración****D: Refrigeración**

## ANEXO 2. Análisis físico químico del Lactosuero

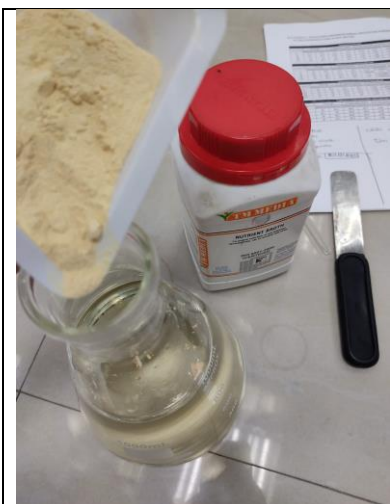


**A:** Acidez



**B:** pH

## ANEXO 3. Preparación de los medios de cultivo



**A:** Preparación del Caldo Nutritivo. (seguir sugerencias del fabricante).



**B:** Caldo Nutritivo

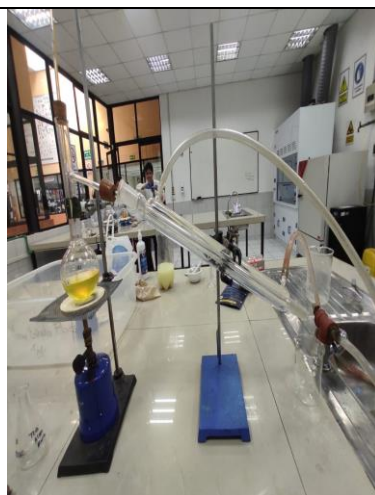


**C:** Suero de leche, es necesario calentarlo a temperaturas de 80 a 90°C para eliminar cualquier microorganismo que pueda afectar en el proceso.

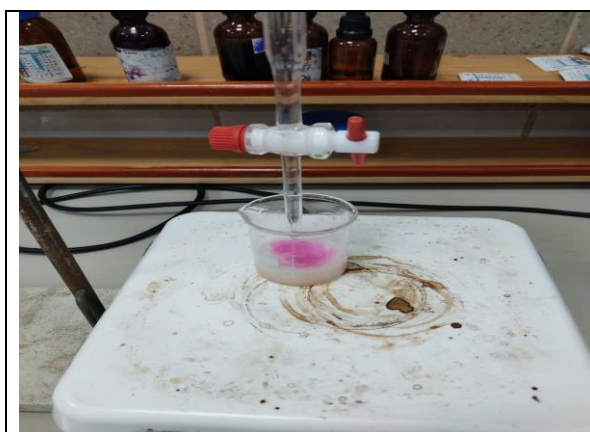
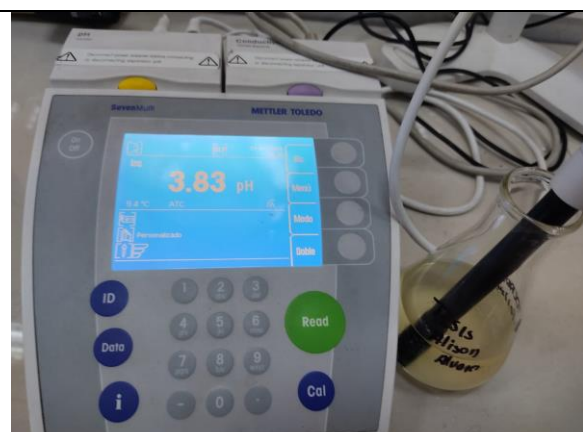
**ANEXO 4.** Suplementación de los extractos al Lactosuero**A:** Extracto de levadura**B:**  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , Fosfato de amonio**C:** Medios con sus respectivos suplementos.

**ANEXO 5.** Inoculación de las bacterias y fermentación.**A:** Bacterias y medios de cultivo.**B:** Incubadora con la temperatura de 37°C**C:** Incubadora con la temperatura de 42°C.**D:** Medios.**ANEXO 6.** Extracción de ácido láctico



**A:** Filtrado al vacío**B:** Destilación**C:** Producto obtenido

### ANEXO 7. Caracterización del ácido láctico por acidez titulable y pH.

**A:** Acidez Titulable**B:** Determinación de pH.