



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**Título
APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LA LECHE PARA LA
OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.**

Trabajo de Titulación para optar al título de Ingeniero Agroindustrial

Autor:

Lema Guamán Jaime Arturo

Tutor:

MsC. Mario Hernán Salazar Vallejo.

Riobamba, Ecuador. 2023

DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, **Jaime Arturo Lema Guamán**, con cédula de ciudadanía **0603708777**, autor del trabajo de investigación titulado: “**APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LA LECHE PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**”, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 22 de marzo del 2023.



Jaime Arturo Lema Guamán

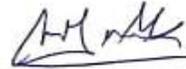
C.I: 0603708777

DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Tutor y Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación "APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LA LECHE PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO" por JAIME ARTURO LEMA GUAMÁN, con cédula de identidad número 0603708777, certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha asesorado durante el desarrollo, revisado y evaluado el trabajo de investigación escrito y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba a 22 de marzo del 2023.

PhD. Darío Javier Baño Ayala
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE
GRADO



Firma

MgS. Daniel Alejandro Luna Velasco
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
GRADO



Firma

MgS. Sonia Lourdes Rodas Espinosa
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
GRADO



Firma

MsC. Mario Hernán Salazar Vallejo
TUTOR



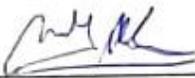
Firma

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

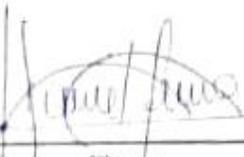
Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación "APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LA LECHE PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO", presentado por JAIME ARTURO LEMA GUAMÁN, con cédula de identidad número 0603708777, bajo la tutoría de MsC. Mario Hernán Salazar Vallejo; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor, no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba a 22 de marzo del 2023.

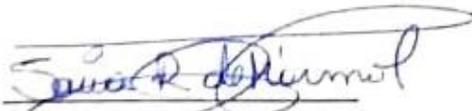
PhD. Darío Javier Baño Ayala
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE
GRADO


Firma

MgS. Daniel Alejandro Luna Velasco
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
GRADO


Firma

MgS. Sonia Lourdes Rodas Espinosa
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
GRADO


Firma

CERTIFICADO ANTIPLAGIO



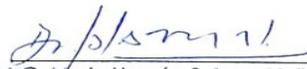
Dirección
Académica
VICERRECTORADO ACADÉMICO



CERTIFICACIÓN

Que, **LEMA GUAMÁN JAIME ARTURO** con CC: **0603708777**, estudiante de la Carrera **INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL, NO VIGENTE**, Facultad de **INGENIERÍA**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE LA LECHE PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**", cumple con el 9%, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **URKUND**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente, autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 7 de marzo de 2023


MSc. Mario Hernán Salazar Vallejo
TUTOR

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por darme sabiduría, salud, vida, la fuerza y entereza para terminar mis estudios y darme la perseverancia por escribir mi tesis.

A mi esposa Gaby por su apoyo incondicional y a mis hijos Josué, Jaime y Jeremías por que estuvieron a mi lado en los momentos buenos y difíciles donde ustedes son el motor que me impulsa para seguir luchando día a día.

A mis hermanos porque siempre estuvieron brindándome su apoyo psicológico y motivación para realizar este sueño.

Jaime Arturo Lema Guamán

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Universidad Nacional de Chimborazo en especial a la facultad de ingeniería, escuela Ingeniería Agroindustrial que me dió la bienvenida al mundo de conocimiento como tal, por el aprendizaje y la construcción de una identidad profesional.

A todos los docentes que compartieron sus conocimientos rigurosos y precisos, por su dedicación, perseverancia y tolerancia, los llevaré conmigo en mi transitar profesional.

Jaime Arturo Lema Guamá

ÍNDICE GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	
DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL	
CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	
CERTIFICADO ANTIPLAGIO.....	5
DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTO	7
ÍNDICE GENERAL	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I. INTRODUCCION.....	15
1.1 Antecedentes.....	15
1.2 Planteamiento del problema.....	16
1.3 Justificación	17
1.4 Objetivos.....	17
1.4.1 Objetivo General.....	17
1.4.2 Objetivos específicos	18
CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Estado del arte.....	19
2.2 Marco teórico.....	20
2.2.1 Suero de la leche.....	20
2.2.2 Composición del suero de la leche.....	20
2.2.3 Tipos de lactosuero	21
2.2.4 Usos del lactosuero	21
2.3 Ácido Láctico.....	21

2.3.1	Propiedades físico-químico de ácido láctico.....	22
2.4	Métodos de obtención de ácido láctico.....	23
2.4.1	Síntesis química	23
2.4.2	Obtención biotecnológica	23
2.4.3	Fermentación láctica	23
2.4.4	Bacterias ácido lácticas.	24
2.4.5	Factores que afectan al crecimiento de género <i>Lactobacillus</i> y la eficiencia en la producción de ácido láctico.	25
2.5	Separación y purificación de ácido láctico	26
2.6	Métodos de determinación de ácido láctico.....	26
2.6.1	Acidez titulable	27
2.6.2	Densidad	27
2.6.3	Medición de pH.....	27
2.7	Usos de ácido láctico	27
2.7.1	Industria alimentaria.	27
2.7.2	Cosmetología.	28
2.7.3	Medicina	28
CAPÍTULO III. METODOLOGIA.....		29
3.1	Tipo de Investigación.....	29
3.2	Diseño de investigación	29
3.3	Técnicas de recolección de datos	30
3.3.1	Obtención del suero de leche	30
3.4	Lugar de estudio.....	30
3.4.1	Procedimiento.	31
3.4.2	Descripción del proceso de obtención de ácido láctico	32
3.4.3	Pasteurización	34
3.4.4	Fermentación.....	35
3.4.5	Extracción de ácido láctico	35

3.4.6	Evaluación del rendimiento de ácido láctico	36
3.4.7	Envasado	37
3.4.8	Almacenado	37
3.5	Procesamiento de datos.....	37
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		38
4.1	Resultados.....	38
4.1.1	Análisis Físico-químico	38
4.1.2	Análisis microbiológico.....	38
4.1.3	Caracterización de ácido láctico.	39
4.2	Análisis del beneficio/costo	41
4.3	Discusiones	42
4.3.1	Calidad de la materia prima	42
4.3.2	Efectos de la suplementación y la temperatura de fermentación en la producción de ácido láctico.	43
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES		45
5.1	CONCLUSIONES	45
5.2	RECOMENDACIONES.....	46
6	BIBLIOGRAFÍA.....	47
7	ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Propiedades físico-químicas del lactosuero.....	20
Tabla 2: Propiedades físico-químicos de ácido láctico.	22
Tabla 3: Matriz experimental	29
Tabla 4: Descripción de los tratamientos	30
Tabla 5: Resultados del análisis físico-químico del suero de leche	38
Tabla 6: Resultados del análisis microbiológico del suero de leche en estudio	38
Tabla 7: Resultados de acidez titulable y pH.	39
Tabla 8: Características físico-químicas de ácido láctico.....	40
Tabla 9: Costo de materia prima e insumos.	41
Tabla 10: Costos de producción y precio de venta.....	41
Tabla 11: Análisis beneficio/costo	42
Tabla 12: Matriz de datos de resultados de acidez titulable.....	56
Tabla 13: Descripción de los resultados entre factores	56
Tabla 14: Análisis de varianza (ANOVA) Acidez titulable.....	57
Tabla 15: Prueba estadística de normalidad	58
Tabla 16: Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos	58
Tabla 17: Prueba de Tukey para comparaciones por subconjuntos homogéneos entre grupos.....	59
Tabla 18: Matriz de datos de los resultados de pH.....	61
Tabla 19: Estadístico Descriptivo de la medición del pH	61
Tabla 20: Análisis de varianza ANOVA de pH.	62
Tabla 21: Prueba de normalidad con los datos de pH	63
Tabla 22: Comparaciones múltiples con prueba de Tukey	63
Tabla 23: prueba de Tukey del pH en subconjuntos	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1: Diagrama de flujo para la obtención de ácido láctico	31
Ilustración 2: Ficha tecnica	50
Ilustración 3: Pasteurización del suero de leche.	52
Ilustración 4: Análisis físico químico	52
Ilustración 5: Fermentación	53
Ilustración 6: Extracción de Ácido Láctico	54
Ilustración 7: Caracterización de ácido láctico por Acidez Titulable y Prueba de pH.	55
Ilustración 8: Acidez titulable con respecto a la temperatura de fermentación.	60
Ilustración 9: Resultados de pH con respecto a la temperatura	65

RESUMEN

La conservación del medio ambiente es uno de los temas de mayor interés social en los últimos tiempos, es por ello que se busca incentivar a las industrias a reutilizar los residuos como sustrato a través de procesos biotecnológicos. El objetivo de este estudio fue utilizar suero de leche como materia prima para la obtención de ácido láctico, en condiciones anaerobias de fermentación para el crecimiento del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Se realizó el análisis fisicoquímico y microbiológico del lactosuero para garantizar la calidad del lactosuero como materia prima basado en la NTE INEN 2594. El suero fue previamente pasteurizado a 85°C por 15 minutos. Se estudiaron variables como suplemento el extracto de levadura con fuente de nitrógeno y vitaminas y la variable temperatura de fermentación a 38°C y 43°C esto con el objetivo de optimizar el consumo de lactosa por parte de las bacterias lácticas. Para definir las condiciones ideales que permitieron maximizar la productividad del ácido láctico, se realizaron 6 tratamientos experimentales con 3 repeticiones de cada uno, con esto se pudo determinar el mejor tratamiento. La extracción de ácido láctico se realizó a partir del caldo fermentado mediante filtración al vacío y destilación simple. Los datos se registraron en la plantilla de Microsoft Excel y el posterior análisis de los resultados mediante la técnica estadística ANOVA, en la que se llevó a cabo la comparación de las medias individuales, la comparación de diferencias entre factores y la selección del mejor tratamiento a través del análisis con Tukey. Mediante el estudio de la acidez titulable y la medición del pH, se determinó que se dieron condiciones adecuadas en la maximización de la producción de ácido láctico en el tratamiento T4 en combinación con Factor "A1" con el suero suplementado con extracto de levadura + CaCO₃ en una concentración de 0.5% v/v y Factor "B" que es la temperatura de fermentación a 43°C, inoculado con bacterias ácido láctica a 0,1% m/v, alcanzando un valor de 23.29 g/L de ácido láctico, otro parámetro físico-químico es el pH donde se obtuvo un valor de 3.09 en el producto final.

Palabras claves: Lactosuero, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, suplemento, Biotecnológico, fermentación, ácido láctico.

ABSTRACT

The conservation of the environment is one of the issues of most significant social interest in recent times, which is why it seeks to encourage industries to use waste to use it as a substrate through biotechnological processes. The objective of this study was to use whey as raw material to obtain lactic acid, determining the appropriate conditions for the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* by anaerobic fermentation. The serum was previously pasteurized at 85°C for 15 minutes. The physicochemical and microbiological analysis of the whey was to guarantee the quality of the whey as a raw material according to the NTE INEN 2594 Standard and variables such as supplement, yeast extract with a source of nitrogen and vitamins + calcium carbonate neutralizer of pH and temperature were studied. Fermentation at 38°C and 43°C this is to optimize the consumption of lactose by lactic acid bacteria and to define the ideal conditions that allowed to maximize of the productivity of lactic acid. Six experimental treatments were carried out with three repetitions, so it was possible to determine the best treatment. Lactic acid extraction was performed from the fermented broth by vacuum filtration and simple distillation. The data was recorded in the Microsoft Excel template, and the subsequent analysis of the results using the ANOVA statistical technique, in which the individual means, the comparison of differences between factors, and the selection of the best treatment were carried out through analysis with Tukey. By studying the titratable acidity and measuring the pH, it was determined that adequate conditions were given to maximize the production of lactic acid in the T4 treatment in combination with Factor "A1" with the serum supplemented with yeast extract. + calcium carbonate in a concentration of 0.5% m/v and Factor "B" which is the fermentation temperature at 43°C, inoculated with lactic acid bacteria at 0.1% m/v reaching a value of 23.29 g/L of lactic acid, another physical-chemical parameter is the pH where a weight of 3.09 in the final product.

Keywords: Whey, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, supplement, Biotechnological, fermentation, lactic acid.



Reviewed by:

Mgs. Marcela González Robalino

English Professor

c.c. 0603017708

CAPÍTULO I. INTRODUCCION.

1.1 Antecedentes.

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países industrializados y en desarrollo, el suero de leche y algunos productos que contienen lactosueros son considerados aliados en la industria alimenticia, especialmente en Estados Unidos, Australia y la Unión Europea, quienes son los mayores consumidores de este producto, aunque se debe considerar que en el mundo se producen unos 190 millones de toneladas de suero de leche por año. Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. La composición de lactosuero varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles. (Parra, 2009).

Según datos del Centro de la Industria Láctea (CIL, 2022), En Ecuador, se generan cerca de 900 mil litros de suero al día, pero solo el 10% es utilizado en la industria, esta subutilización se debe a que, en 2019, la Asamblea Nacional resolvió sancionar el uso, oferta o venta de suero de leche con fines comerciales, excepto para el suero en polvo y sus usos para la alimentación animal.

El lactosuero es el mayor subproducto obtenido durante el procesamiento de la leche en la producción de quesos, el cual presenta un alto contenido de nutrientes y se desaprovecha desechándolo generalmente en vertederos, causando un problema de contaminación ambiental. (Rivadeneira, 2021).

La fermentación láctica es uno de los procesos más empleados para la conservación de alimentos. Su efectividad se relaciona con la formación de metabolitos, ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas, en combinación con un descenso en la actividad de agua. El efecto de estos metabolitos se refuerza con la interferencia microbiana, ya que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos contaminantes, mientras otros proliferan en el mismo sustrato. Sin embargo, con el fin de que esta interferencia sea efectiva, la flora a inhibir debe ser superada por la flora adicionada (Martín, 2019)

La fermentación láctica a partir del suero de leche podría ser una de las soluciones para este subproducto de la industria láctea que es considerado como un contaminante, por lo cual, estudios demuestran que se puede obtener ácido láctico de la

fermentación de este residuo, para ello se debe establecer un sistema de control del proceso, el cual es llevado a cabo en equipos denominados biorreactores, que son diseñados mediante estudios rigurosos, para su posterior construcción y operación, con la finalidad de obtener la máxima producción de proceso (UTPL, 2021).

1.2 Planteamiento del problema

Los residuos de la industria láctea en mayor porcentaje es el lactosuero, que son desechados indiscriminadamente a los vertederos ocasionando una contaminación de los recursos hídricos, un daño a los ecosistemas, así como a la flora y fauna, es cierto que existen estudios de utilización de este subproducto, pero no existe un aprovechamiento necesario en distintas áreas de aplicación. El suero lácteo no puede consumirse directamente, ni utilizar en la elaboración de otros productos lácteos sin un tratamiento previo.

Según (Cisneros, 2022) menciona que, el desconocimiento de los beneficios del uso del suero de leche obtenido después de procesos tecnológicos de la materia prima ha inducido a un desperdicio de este alimento. En la actualidad aún son pocos los procesos enfocados al aprovechamiento del suero de leche para la elaboración de bebidas, alimentos y suplementos proteicos, sin embargo, aún se liberan grandes cantidades que contaminan el medio en donde son desechados sin un fin. Solo en el 2019 se produjeron 34.835L de suero de leche según información recabada de los principales productores de queso del país. La controversia entre si es benéfico o no para la salud de personas y animales, no ha permitido el avance en el uso adecuado de este subproducto lácteo.

Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental, debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto. Las proteínas y la lactosa se transforman en contaminantes cuando el líquido es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, ya que la carga de materia orgánica que contiene permite la reproducción de microorganismos produciendo cambios significativos en la DBO del agua contaminada (Denicia, 2009).

La necesidad de las industrias lácteas es buscar alternativas para disminuir el impacto ambiental que causa la elaboración de sus productos y dar un mejor uso al suero lácteo como subproducto; por ello este estudio sirve para disminuir considerablemente el impacto ambiental que causa el suero de leche al ser arrojado al medio ambiente ya que en la mayoría de los casos se considera a éste como un desecho de la elaboración de productos lácteos.

1.3 Justificación

El lactosuero puede ser utilizado como medio de cultivo para la producción de biomasa (proteína unicelular como la levadura para panificación), metabolitos (lípidos, pigmentos, alcoholes, ácidos orgánicos, biopolímeros) y enzimas. En este medio, la lactosa es la principal fuente de carbono para los microorganismos, incluso se ha utilizado para células vegetales. Además, el lactosuero suele emplearse para la conservación y propagación de cultivos lácticos o en la elaboración de bebidas fermentadas. (Denicia, 2009)

Esta investigación está encaminada a la obtención de ácido láctico mediante el aprovechamiento del suero de leche con el cual el aporte a contrarrestar la contaminación ambiental causado por este residuo y al mismo tiempo cubrir las necesidades de aplicación de ácido láctico como aditivos en la industria alimentaria, como, acidificante y potenciador del sabor en carnes, pescados, bebidas, confitería, panadería, frutas, verduras y lácteos., así también por sus propiedades antibacterianas en detergentes, para ajustar el pH en cosméticos y entre otros. Es por ello la necesidad de obtener un producto de origen natural con un buen perfil medioambiental y biodegradable, donde, el estudio de mercado del ácido láctico está disponible para el ácido láctico de origen natural y sintético. Por consiguiente, es importante que la industria quesera tenga otras opciones para aprovechar el lactosuero transformando a nuevos subproductos como aditivos alimentarios, preferentemente para el consumo humano, con el fin de recuperar el valor monetario en las industrias lácteas y aprovechar los residuos con gran valor nutricional.

Las bacterias ácido-lácticas son utilizadas para fermentar o crear cultivos empleados en la elaboración de lácteos, constituyendo un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares que transforman a ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Los principales impulsores del mercado del ácido láctico son el aumento de la demanda en las aplicaciones alimentarias del ácido láctico, la disponibilidad de materias primas baratas, las diversas propiedades funcionales del ácido láctico y la aprobación reglamentaria de las normas internacionales.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Aprovechar el suero de la leche mediante la obtención de ácido láctico.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar las características físico-químico y microbiológico del suero de leche.
- Obtener ácido láctico a partir del suero de la leche mediante homofermentación en condiciones anaeróbicas.
- Caracterizar el ácido láctico obtenido de la fermentación del suero de la leche.

CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO.

2.1 Estado del arte

Según (Betancourt, 2020) en el estudio de obtención de ácido láctico, se optó por utilizar lactosuero y almidón de papa por su bajo costo como sustrato para el estudio del efecto individual y su interacción con las bacterias lácticas utilizando *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus lactis*. El experimento consistió en adición en diferentes niveles de volumen de bacteria activada en concentraciones de 100 μL , 500 μL y 1000 μL en 100ml de lactosuero suplementado que son factores de estudio, la temperatura de fermentación fue de 37°C, pH inicial de 6,5 y el tiempo de 24h establecidos como factores fijos, con la finalidad de aumentar el rendimiento de producción de ácido láctico se procedió a enriquecer el lactosuero y la solución del almidón de papa con el 20% de lactosa previo a la fermentación, este es un requerimiento mínimo de las bacterias lácticas siguiendo la ruta homofermentativas donde los resultados de acidez titulable indican que el método 1 (lactosuero + *Lactobacillus Bulgaricus*) contiene mayor concentración de ácido láctico.

De acuerdo a (Cadena, 2021), la conservación del medio ambiente es un tema de gran interés social por el cual se busca impulsar a las industrias la utilización de los residuos agroindustriales como sustratos a través de procesos de biotransformación. Por ello la importancia de obtener ácido láctico a base de lactosuero utilizando *Lactobacillus casei*. a través del estudio experimental, el lactosuero mostró ser un sustrato potencial para la producción de ácido láctico al ser suplementado con extracto de levadura, sulfato de amonio y peptona, inoculado con *Lactobacillus casei* como variables de estudio y a temperatura de fermentación de 29, 37 y 45°C. La determinación de los parámetros cinéticos de fermentación se realizó a partir del balance de biomasa, obteniéndose los resultados de velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td), tiempo de fermentación en lotes (t) y rendimiento producto – sustrato en el cultivo por lotes (Y_p/s) donde el T3 presenta mejor resultado con 46,80% a una temperatura de fermentación de 45°C.

Así mismo (Arroyo, 2019) mediante su investigación afirma que el lactosuero es apto para la obtención de productos de alto valor agregado, como el ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei* en un proceso continuo. Los factores que se estudió son la temperatura (29.0, 37.0, 45.0°C) y el flujo de alimentación (120, 300, 480 ml/h) determinando la mejor combinación para la caracterización del ácido láctico. Se determinó que las mejores condiciones que permiten la maximización de productividad de ácido láctico son a 45°C y 480 ml/h de flujo de alimentación, alcanzando valores máximos de productividad total de 1.36 g/h, manteniendo el fermentador a un nivel constante de biomasa por períodos prolongados y que puede ser la base de eficientes sistemas de fermentación.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Suero de la leche.

El lactosuero (LS) es el líquido remanente que resulta de la coagulación de las proteínas caseicas de la leche durante la elaboración de queso. El LS representa 90% del volumen total de la leche y contiene la mayor parte de los componentes solubles en agua, tales como carbohidratos, minerales, vitaminas hidrosolubles y proteínas solubles. El LS conserva 50% del total de los sólidos de la leche y el 20% de las proteínas, Las proteínas del lactosuero (PLS) tienen propiedades funcionales y nutricionales únicas, lo cual ha aumentado la demanda no solo del LS; sino también de sus hidrolizados, ya que actualmente los consumidores están interesados en consumir alimentos funcionales. (Rodríguez, 2017)

2.2.2 Composición del suero de la leche

Según (Betancourt, 2020) El lactosuero está compuesto principalmente por agua, lactosa, proteínas solubles, mínima presencia de grasa, sales minerales y vitaminas hidrosolubles. Factores como origen de la leche, tratamiento térmico, tipo de queso, técnica de elaboración de queso y entorno de almacenamiento definen la composición final del suero obtenido. La Tabla 1, presenta la proporción promedio de cada parámetro mencionado.

Tabla 1

Propiedades físico-químicas del lactosuero

Parámetros	Valor	Unidad
Lactosa	4,85	%
Proteína	0,80	%
Ph	6,47	-
Contenido de cenizas	0,80	%
Acidez titulable	0,05	%
Grasa	0,50	%

Porcentaje de agua	93,2	%
--------------------	------	---

(Betancourt, 2020)

2.2.3 Tipos de lactosuero

Según (Betancourt, 2020), de acuerdo con el proceso de elaboración de queso, las propiedades fisicoquímicas y el sistema de coagulación empleado, el lactosuero puede ser clasificado como ácido o dulce.

El suero dulce: se obtiene mediante la coagulación enzimática de las caseínas al pH fisiológico de la leche (6.5 a 6.8), utilizando cuajo comercial estandarizado (quimosina u otra proteasa con actividad similar). Presenta un alto contenido de lactosa (46 g/L a 65 g/L) y proteína (6 g/L a 12 g/L), con bajo contenido de grasa (3 g/L a 5 g/L) y acidez (máximo 2 g/L de ácido láctico). Este suero proviene de la elaboración tradicional de queso fresco, panela y Chihuahua.

El suero ácido: proviene de quesos como el poro, Oaxaca, cotija y cocido, donde, en estos últimos, se utiliza una coagulación mixta en su elaboración (disminución del pH de la leche y adición de cuajo).

2.2.4 Usos del lactosuero

El LS es una fuente de proteína de alta calidad económicamente accesible. El 50% del LS producido a nivel mundial es tratado y transformado en productos alimenticios. El 45% es utilizado directamente en forma líquida, 30% se deshidrata para su uso como polvo, 15% se industrializa para extraer lactosa y con el resto se elabora concentrado proteico de LS en polvo. En países como Nueva Zelanda y Japón, esta materia prima se utiliza en la elaboración de fórmulas lácteas, pastas dentífricas, alimentos nutracéuticos, pomadas antifúngicas y en la industria. Además, se emplea en la elaboración de productos lácteos, cárnicos, panadería, bebidas, postres, confitería, productos farmacéuticos, formulaciones infantiles y alimentos dietéticos, entre otros. Uno de los usos más comunes del LS es como ingrediente en la producción de bebidas. Éstas se caracterizan por proporcionar energía, regular la temperatura del cuerpo, evitar la deshidratación y calmar la sed. Otro uso común que se le da a este subproducto en la industria alimentaria, es para la producción de requesón o queso ricota. (Rodríguez, 2017)

2.3 Ácido Láctico

Es un ácido orgánico natural que puede ser producido por fermentación o síntesis química, se encuentra presente en muchos alimentos, tanto de forma natural o como producto de la fermentación microbiana en varios alimentos fermentados. (Machado, 2019).

2.3.1 Propiedades físico-químico de ácido láctico

El ácido láctico es un ácido carboxílico cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, este compuesto quiral tiene dos isómeros ópticos, uno de ellos es conocido como L(+) ácido láctico (isómero biológicamente importante) y el otro es su imagen especular o D(-) ácido láctico. El ácido láctico isómero L(+) tiene una rotación específica de $+3.8^\circ$, es decir, que la dirección de la luz polarizada va en sentido horario. (Flores, 2020)

Tabla 2

Propiedades físico-químicos de ácido láctico.

Parámetros	Características
Formula química	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$
Masa molar	90,080 g/mol
Propiedades físicas	
Estado	Líquido
Color	Incoloro, ligeramente amarillento
Punto de fusión	18 °C
Punto de ebullición	122 °C
Solubilidad	
Agua	Miscible
Etanol	Miscible
Éter	Miscible
Propiedades químicas	
Acido orgánico débil	

Fuente: (Johana, 2020)

2.4 Métodos de obtención de ácido láctico

De acuerdo a (Flores, 2020) el ácido láctico puede ser obtenido por procesos químicos y por la fermentación microbiana; sin embargo, el método de obtención con bacterias ácido lácticas tiene ventaja sobre el otro método, debido a que de él se puede extraer ácido láctico puro, mientras que por la síntesis química siempre quedarán mezclas racémicas. El ácido láctico producido en el proceso bacteriano tradicional debe neutralizarse para mantener el pH dentro del intervalo de viabilidad de los microorganismos. A escala industrial, esto se hace típicamente usando hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) o carbonato de calcio, que se añade al medio de fermentación. Además, la recuperación del ácido láctico a partir de la sal de lactato de calcio se basa en ácidos fuertes como el ácido sulfúrico (H_2SO_4).

2.4.1 Síntesis química

Está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico. Esta reacción ocurre en fase líquida a altas presiones atmosféricas, el lactonitrilo bruto es recuperado y purificado mediante una evaporación. Posteriormente es hidrolizado al ácido láctico en presencia HCl concentrado o en presencia de H_2SO_4 para producir sal de amonio y ácido láctico. Finalmente, el ácido láctico se esterifica con metanol para producir el lactato metílico, el cual se recupera y purifica a través de una evaporación e hidrólisis con agua en presencia del catalizador ácido para producir ácido láctico y metanol, éste último es recuperado y reciclado con otros fines. (Betancourt, 2020)´.

2.4.2 Obtención biotecnológica

Está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos. Se emplean bacterias del ácido láctico (LAB) homofermentativas. (Gaviria, 2020).

2.4.3 Fermentación láctica

Según (Thongchul, 2013 citado en Flores, 2020, p.31), la fermentación microbiana es un proceso amigable con el medio ambiente por tanto proporciona beneficios a nivel económico y ambiental. Las bacterias ácido lácticas se dividen en dos grandes grupos:

2.4.3.1 Homofermentativas.

Las bacterias de este grupo convierten más del 85% de glucosa en ácido láctico (principal producto de la fermentación). Fermentan 1mol de glucosa en 2 moles de ácido

láctico, generando un rendimiento neto de 2 ATP por mol de glucosa metabolizado, el ácido láctico es el principal producto de esta fermentación, (Flores, 2020).

2.4.3.2 Heterofermentativas.

Este grupo de bacterias ácido lácticas convierte el 50% de glucosa en ácido láctico más etanol o ácido acético y 50% de CO₂. Fermentan 1 mol de glucosa en 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol (o ácido acético) y 1 mol de CO₂. Para el inicio del proceso de producción de ácido láctico se inicia con un pretratamiento del sustrato, seguido de la fermentación por lotes o por sistema continuo. (Flores, 2020).

2.4.4 Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se caracterizan por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Son cocos o bacilos Gram positivos, no forman esporas, inmóviles, anaerobios o microaerófilos y son oxidasa y catalasa negativos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han aislado de diferentes nichos, incluidos alimentos, plantas y en diferentes hábitats de animales, incluido el tracto digestivo. (Requena, 2018).

Según el autor antes citado, las bacterias lácticas se clasifican en:

Lactobacillus delbrueckii: es una bacteria gram positiva, con forma de bacilo alargado y de extremos redondeados. Es catalasa negativa, homofermentativa, y no presenta flagelo. Pertenece a un grupo de especies que lleva su nombre como especie tipo. Está dividida en seis subespecies. A algunas de estas subespecies las consideran probióticos y las emplean en la industria alimenticia. Su principal uso es para la fermentación de productos lácteos y para la producción de quesos y yogur. Fermenta carbohidratos, es decir, glucosa, lactosa, fructosa, manosa y algunas veces galactosa. Es termófila y tiene una temperatura de crecimiento de hasta 48 o 50 °C.

Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus: fue aislada por primera vez de leche búlgara. Esta subespecie es empleada, en combinación con *Streptococcus thermophilus*, para la producción comercial de yogur. También se emplea en la producción de quesos suizos e italianos. El papel principal en la fabricación de yogur es acidificar la leche, produciendo una gran cantidad de ácido láctico a partir de la lactosa, también presenta actividad probiótica.

Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis: fue aislado inicialmente de una fuente láctea. El empleo de esta subespecie es principalmente para la producción comercial de queso mozzarella. Bacteria con un metabolismo homofermentativo, y produce ácido L (+) láctico como subproducto metabólico a partir de diversos azúcares como la lactosa o la glucosa.

Además, se ha descubierto que puede producir ácido D (-) láctico al ser cultivado en pH bajos, ésta es la razón que es uno de los microorganismos más importantes en la industria láctea.

2.4.5 Factores que afectan al crecimiento de género *Lactobacillus* y la eficiencia en la producción de ácido láctico.

Según (Caiza, 2015), las bacterias ácido lácticas se consideran como un grupo de bacterias más exigentes ya que requieren sustratos nitrogenados y carbonatados complejos, además de ello también requieren sustratos fosforados y vitaminas. Las bacterias ácido lácticas son anaerobias micro-aerotolerantes es decir que se reproducen en presencia del oxígeno y además de ello son bacterias grampositivas aerotolerantes es decir que no poseen un sistema respiratorio

2.4.5.1 pH

Para cualquier microorganismo el pH es un factor fundamental que define el crecimiento del mismo y su comportamiento, cada especie posee un intervalo para su crecimiento y un valor óptimo de pH, las bacterias lácticas por general son acidófilas teniendo un pH optimo entre valores de 4.0 a 6.0. Usualmente estas pueden crecer en un amplio rango de pH aun si se encuentran en un valor lejano a su punto óptimo, aunque sí se sobrepasan sus límites de tolerancia o hay variaciones dramáticas puede ocasionar daños en el microorganismo como alteraciones en su membrana plasmática, inhibición en la actividad enzimática o alterar la ionización de sustratos lo que reduciría su disponibilidad para el organismo (Aragón, 2015).

2.4.5.2 Temperatura de fermentación

Según (Aragón, 2015), la fermentación láctica tiene lugar por lo general a temperaturas de 40-45°C, es decir que son las condiciones óptimas de crecimiento del cultivo. La temperatura es un factor de gran importancia en especial para los microorganismos, los cuales suelen ser muy susceptibles a cambios en su temperatura ambiente, uno de sus mayores efectos es en las propiedades catalíticas de las enzimas las cuales poseen un punto óptimo en la cual alcanzan su actividad enzimática máxima, por debajo de este punto estas pierden progresivamente su velocidad de catálisis, temperaturas superiores logran desnaturalizar la enzimas así como transportadores y demás proteínas, la temperatura además puede causar serios efectos en la membrana celular, solidificándose a bajas temperaturas por su alta concentración en lípidos o desestabilizándose y desintegrándose a temperaturas muy elevadas.

2.4.5.3 Suplementos

La influencia de la deficiencia en péptidos (fuente de nitrógeno), en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero es la razón por lo que se emplean diferentes suplementos.

Por otra parte, el contenido de proteínas es alto y es un excelente medio para los microorganismos que requieren aminoácidos y son capaces de hidrolizar las proteínas. Las LAB generalmente tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su capacidad limitada para sintetizar elementos para su propio crecimiento. Si bien las fuentes de carbono se utilizan para generar energía para la proliferación, requieren otros nutrientes como fuentes de nitrógeno, vitaminas y minerales para el mantenimiento, el crecimiento celular y la secreción de ácido láctico. (Aragón, 2015).

2.4.5.4 Extracto de levadura

El extracto de levadura es rico en nitrógeno, vitaminas y otros compuestos estimulantes en el crecimiento microbiano, razón por la que este es usado como ingrediente en los medios para el cultivo de microorganismos. Por otro lado, todos los estudios realizados sobre el efecto de este en los procesos fermentativos han demostrado un aumento en la producción de ácido láctico (Ortiz, 2018).

2.5 Separación y purificación de ácido láctico

Según (Castro, 2017) afirma que la separación, purificación y preconcentración del ácido láctico obtenido mediante fermentación es difícil debido a su comportamiento químico, en los procesos convencionales se recupera por precipitación de lactato de calcio con hidróxido de calcio recuperando por filtración.

Así mismo (Gómez, 2019) La principal dificultad en la biosíntesis de ácidos orgánicos tiene que ver con su recuperación que, además, es costosa. Al igual que en la síntesis química, en la síntesis microbiana se persigue la pureza de los productos y que no se formen co-productos. En forma general la separación del caldo fermentativo en el que los ácidos orgánicos son principalmente, productos extracelulares. La precipitación, destilación, membranas de separación, filtración y ultrafiltración son las técnicas más utilizadas en una primera fase de purificación, la cromatografía y la cristalización en la fase de refinamiento de los ácidos orgánicos.

2.6 Métodos de determinación de ácido láctico

El proceso fermentativo de producción de ácido láctico debe ser optimizado en términos de las variables operativas para mejorar el crecimiento de microorganismos y la producción del metabolito de interés. Al mismo tiempo, la determinación (presencia/ausencia) y cuantificación (concentración) de ácido láctico, también debe ser optimizada como técnica analítica cuyo rango de linealidad y respuesta pueda ser reproducible y confiable. (Caiza, 2015)

2.6.1 Acidez titulable

Según la normativa NTE (INEN, 2011) la acidez titulable de la leche es “la acidez de la leche, expresada convencionalmente como contenido de ácido láctico, y determinada mediante procesos normalizados”. Se titula la acidez con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador.

Siguen siendo los métodos recomendados por la Norma NTE INEN 13 para su cuantificación y por ello, se siguen usando para nuevos desarrollos en un rango de determinación en g/L de ácido láctico (Flores, 2020).

2.6.2 Densidad

La densidad es una propiedad básica de cualquier líquido y se define como su masa por unidad de volumen. Las unidades más comunes de la densidad son g/ml y kg/m³. En el caso concreto del agua, su densidad es 1g/ml o bien 1000 kg/m³ (Huerta, s.f).

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

2.6.3 Medición de pH

El pH es el Potencial de Hidrógeno. Es una medida para determinar el grado de alcalinidad o acidez de una disolución. Con el pH determinamos la concentración de hidrogeniones en una disolución. Un hidrogenión es un ion positivo de Hidrógeno, es un «cachito con carga positiva» del Hidrógeno (Huerta, s.f).

2.7 Usos de ácido láctico

El ácido láctico es considerado GRAS (Generalmente reconocido como seguro) por la FDA (Administración de alimentos y fármacos), A su vez su uso en la industria farmacéutica e industrial como materia prima para la producción de éster de lactato, ácido propanóico, ácido acrílico entre otros. El ácido láctico es un conservante y acidulante natural o sintético. Los aditivos alimentarios consumidos con moderación, en las cantidades que vienen añadidas de fábrica en los productos, en personas sin alergias o intolerancia a ellos, no suponen un riesgo para la salud si está autorizada su uso industrial como ingrediente para ese alimento o bebida (Arroyo, 2019).

2.7.1 Industria alimentaria.

Es uno de los ácidos orgánicos más utilizados en la industria alimentaria como conservante, acidulante y saborizante, siendo un ingrediente importante para la producción de productos cárnicos curados, productos fermentados, y productos marinados. Se utiliza como conservante y antioxidante en la industria de los dulces y pasteles. También se utiliza en

refrescos y productos congelados. El ácido láctico en la industria cárnica como alternativa para reducir la contaminación microbiológica en la superficie de canales bovinos (Gomez, 2018).

2.7.2 Cosmetología.

En concentraciones bajas, el ácido láctico actúa como hidratante y acidificante de tal manera que favorece la elasticidad de la piel, mientras que a soluciones altas actúa como peeling de renovación celular. En bebés resulta ser un agente bactericida para la piel a una solución del 10% y es muy común su uso para corregir el pH de fórmulas como champús, emulsiones, geles, jabones, etc. (Guamán, 2022).

2.7.3 Medicina

El ácido láctico se ha convertido en un producto importante en la industria médica. Al poder ser asimilado por el organismo, ha encontrado múltiples aplicaciones en cirugía, ortopedia, ortodoncia, oftalmología, traumatología y otras ramas de la medicina y como soporte para el suministro controlado de numerosos medicamentos. Los siguientes son algunos de los usos en este campo: Estructuras biodegradables para la ingeniería de tejido, Implantes reconstructivos y bioabsorbibles, placas absorbibles para fijación interna en fracturas de cara, cirugía ortognática y craneofacial (Herriman, 2005).

CAPÍTULO III. METODOLOGIA.

3.1 Tipo de Investigación.

Es una investigación cuantitativa ya que consistió en recolectar y analizar datos estadísticos con resultados numéricos en aspectos de la calidad de la materia prima y la cuantificación del ácido láctico aplicando distintos análisis como, físico-químico, microbiológico del suero de la leche y la caracterización de ácido láctico mediante acidez titulable y medición de pH.

Es un estudio experimental porque se trabajó con dos variables no comprobadas bajo condiciones científicamente aceptables donde en el proceso de la investigación se puede controlar a fin de interpretar los resultados obtenidos.

3.2 Diseño de investigación

En la presente investigación se realizó un estudio cuantitativo experimental, en la cual se analizó dos variables independientes, como factor “A” el efecto de la suplementación de suero de leche con extracto de levadura y CaCO_3 a diferentes concentraciones %(m/v) con respecto a un tratamiento control sin suplemento y como Factor “B” la temperatura de fermentación, con bacteria láctica al 0,1% m/v de concentración en cada unidad experimental.

Tabla 3

Matriz experimental

Factor “A”	Factor “B”	
	Temperatura de fermentación	
Suero suplementado	38°C	43°C
A ₀ Control	Suero de leche sin el suplemento.	
A ₁	Suero suplementado al 0,5 % (m/v)	
A ₂	Suero suplementado al 1,0 % (m/v)	

Nota: El lactosuero fue inoculado con bacteria láctica y suplementado con extracto de levadura y CaCO_3 .

De la combinación de los dos factores en estudio resultaron 6 tratamientos como se detalla en la tabla 4. Se utilizó 250ml de suero de leche para cada tratamiento por triplicado con un tiempo de fermentación de 24 horas.

Tabla 4:

Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Nomenclatura	Descripción
T1	A ₀ B ₁	Control a 38°C
T2	A ₀ B ₂	Control a 43°C
T3	A ₁ B ₁	Suplemento al 0,5% a 38°C
T4	A ₁ B ₂	Suplemento al 0,5% a 43°C
T5	A ₂ B ₁	Suplemento al 1,0% a 38°C
T6	A ₂ B ₂	Suplemento al 1,0% a 43°C

3.3 Técnicas de recolección de datos

3.3.1 Obtención del suero de leche

El suero de leche fue abastecido por la empresa de Lácteos “San Salvador” de la ciudad de Riobamba, se recolectó en frascos de vidrio previamente esterilizadas y trasportadas hasta el laboratorio de control de calidad de la carrera de Ingeniería Agroindustria y almacenados a 4°C en refrigeración.

3.4 Lugar de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de procesos y control de calidad de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Chimborazo UNACH, Riobamba, Ecuador.

3.4.1 Procedimiento.

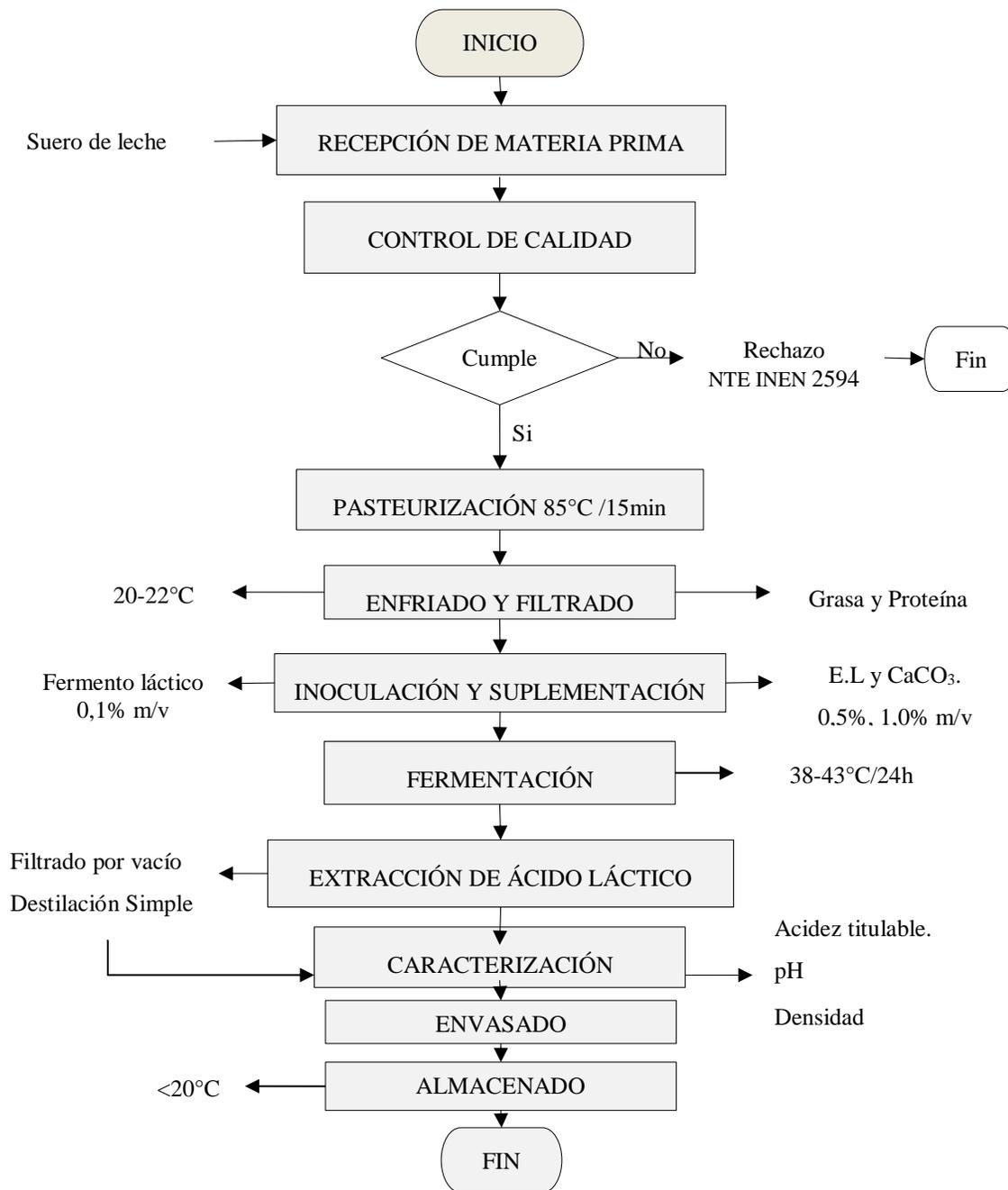


Ilustración 1: Diagrama de flujo para la obtención de ácido láctico

3.4.2 Descripción del proceso de obtención de ácido láctico

3.4.2.1 Recepción de materia prima

Se contó con 6 muestras de suero de leche proveniente de la Empresa de Lácteos “San Salvador” que fueron colectadas, etiquetadas y transportadas en recipientes herméticos de 1 litro previamente esterilizado. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de control de calidad de Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su análisis físico-químico y microbiológico. Todos los análisis se realizaron por triplicado, en tres días de producción diferentes, se tomaron muestras del primer desuere antes del salado de la cuajada y se enviaron a los laboratorios para su análisis.

3.4.2.2 Análisis Físico-químico

Las variables que se tuvieron en cuenta fueron lactosa, proteína láctea, grasa láctea, sólidos totales, cenizas, acidez y pH. Para lo cual, se utilizaron los siguientes protocolos para efectuar los análisis fisicoquímicos:

Para el análisis de contenido de Lactosa, proteína láctea, grasa láctea se utilizó el equipo portátil MILKOTESTER, MILK ANALYZER, que es un sistema de análisis de leche y suero para medir el recuento de células somáticas con 10 ml de muestra por triplicado para cada tratamiento.

3.4.2.3 Sólidos totales

Los análisis de sólidos totales se realizó bajo el método de ensayo NTE INEN 14, el método se basa en el secado de la muestra en la estufa y se determinó por diferencia de peso entre la muestra seca y húmeda, , para lo cual se pesó aproximadamente 10g de suero (m_1) y se colocó en un crisol esterilizado, a continuación se llevó a la estufa a una temperatura de 105°C, hasta obtener peso constante, se dejó enfriar en el desecador y se pesó (m_2). Los resultados se calcularon mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 1: Contenido de sólidos totales.

$$S = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} * 100$$

Donde:

S = contenido de sólidos totales en porcentaje de masa

m = masa de la capsula vacía (g)

m_2 = masa de la capsula con suero (g)

m_1 = masa de la capsula con sólidos totales (g)

3.4.2.4 Cenizas

Las cenizas es el producto resultante de la incineración de los sólidos totales mediante procedimientos normalizados. Para el análisis de cenizas, se usó la muestra seca de sólidos totales y se colocó en la mufla a temperatura de 550°C hasta obtener el resultante de un color gris claro, con la ayuda de pinzas se extrajo el crisol con las cenizas, se trasladó al desecador y se tomó el peso final (m_3).

Ecuación 2: Contenido de cenizas.

$$C = \frac{m_3 - m}{m_2 - m_1} * 100$$

Donde:

C = cantidad de cenizas del suero en porcentaje de masa.

m = masa de la capsula vacía (g)

m_2 = masa de la capsula con suero (g)

m_3 = masa de la capsula con cenizas (g)

3.4.2.4.1 Acidez titulable

La acidez expresada en % de ácido láctico se cuantificó por acidez titulable de acuerdo al método de ensayo a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 13, transfiriendo 20g. de muestra al matraz Erlenmeyer agregando la solución estandarizada de NaOH a 0,1 Normal y fenolftaleína como indicador hasta el viraje a un color rosa. La acidez expresada en % de ácido láctico del suero se calcula mediante la ecuación siguiente;

Ecuación 3: Acidez titulable.

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

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)

m_1 = masa del matraz Erlenmeyer con suero (g)

3.4.2.4.2 pH

Para la cuantificación del pH se realizó en un volumen de 50 ml de lactosuero puro utilizando un pH-metro digital (HACH-sensio3) que es un instrumento científico que mide la actividad del ion hidrogeno en soluciones acuosas indicando su grado de acidez o alcalinidad, el pH es un punto importante para el proceso de fermentación por parte de las bacterias lácticas.

3.4.2.5 Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en la norma NTE INEN 2594 donde está establecido como requisito para la aceptación o rechazo de la materia prima (suero de leche) destinado a posterior procesamiento. Las unidades de muestra se mantuvieron en condición de refrigeración a 4°C durante 12 horas.

Para la siembra, a partir de la unidad de muestra de 1000ml se tomó 0,1 ml de suero de leche, con la ayuda de los tubos de ensayo y las pipetas se realizó diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y posteriormente la siembra en las placas de agar por duplicado homogenizando con movimientos en sentido horario y antihorario, dejamos en reposo 15 min para que se solidifique y finalmente colocamos las cajas invertidos en la incubadora.

Para obtener efectividad en los resultados del análisis microbiológico, fue necesario los medios de cultivo reconstituídos, de calidad uniforme y de grado analítico que es un medio selectivo para los microorganismos en análisis. Todo el material de vidrio como cajas Petri, frascos autoclavables, vasos de precipitado y enseres como espátula, pinzas, fue previamente esterilizados.

3.4.3 Pasteurización

Se realizó un tratamiento térmico a una temperatura de 85°C durante 15 minutos para reducir la carga microbiana presente en el lactosuero, y también la precipitación de toda la proteína contenida en el sustrato.

3.4.3.1 Enfriado

El enfriamiento del suero de leche se realizó con agua fría hasta llegar a una temperatura de fermentación entre 38°C y 43°C, temperatura óptima para el proceso metabólico de bacterias lácticas.

3.4.3.2 Filtrado de lactosuero

Esta operación unitaria consiste en separar los grumos de proteínas formado durante la pasteurización que queda suspendido en el lactosuero, se utilizó un colador de malla plástica esterilizada. Para un mejor filtrado se utilizó una bomba de vacío con el papel filtro Whatman

número 40, con lo cual se separó los sólidos de menor tamaño evitando que dichos cuerpos influyan negativamente en el proceso de fermentación láctica.

3.4.3.3 Inoculación

La cepa utilizada fue el co-cultivo liofilizado *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*, bajo el nombre de, YOGHURT LAT BY E5 especificado en la ficha técnica (anexo 1) en 0,1% m/v de concentración en cada unidad experimental. El microorganismo fue escogido teniendo presente su capacidad homofermentativa de producción de ácido láctico y su uso frecuente en la elaboración del yogur y por varios reportes bibliográficos de producción de ácido láctico a partir de lactosuero inoculado con dicho microorganismo.

3.4.3.4 Suplementación de lactosuero

El suero de leche pasteurizado en un volumen de 250ml, fue suplementado en concentraciones de 0%, 0,5%; 1,0% m/v con extracto de levadura y CaCO₃. que es fuente de nitrógeno y vitaminas como estimulante del crecimiento microbiano a un pH inicial de 6,4 para una fermentación completa.

3.4.4 Fermentación

La fermentación se llevó a efecto en condiciones anaerobias. Este proceso se realizó en los matraces Erlenmeyer previamente esterilizados con 250 ml de sustrato que fueron cubiertos con el papel aluminio para evitar la penetración de la luz y tapadas con válvulas de fermentación-Airlock, para asegurar anaerobiosis durante la fase de producción, estas válvulas de aire protegen de la acción perpendicular del oxígeno para evitar la contaminación durante la fermentación por el tiempo de 24 horas. La fermentación se realizó en dos etapas, la primera a 38°C ±1 y la segunda a 43°C±1 controlando la temperatura en un baño maría.

3.4.5 Extracción de ácido láctico

3.4.5.1 Filtrado al vacío

Luego de 24 horas, el producto resultante de la fermentación, fue filtrado con la ayuda de una bomba de vacío, con el fin de separar la parte sólida que son las células de los microorganismos de la parte líquida que son las enzimas lácticas.

3.4.5.2 Destilación simple

Debido a que el ácido forma ésteres internos de alto punto de ebullición, en este proceso se aplicó la destilación simple que es una técnica de laboratorio utilizada en la separación de sustancias miscibles con diferente punto de ebullición. El caldo fermentado es una mezcla homogénea de lactato, agua y otros componentes con diferente punto de

ebullición, para ello, vertimos 150 ml de caldo fermentado en un balón de destilación lo cual se encaja a un tubo refrigerante, para ello activamos la circulación de agua fría al condensador a través de mangueras de látex y al otro punto del destilador colocamos un vaso de precipitado para recoger el componente evaporado. Se aplicó calor con un reverbero sobre el balón de destilación, donde los componentes más volátiles entre ellos el agua se evaporó, teniendo presente que el punto de ebullición de ácido láctico es de 120°C y el punto de ebullición del agua a 95°C, después de mantener el volumen constante, el producto concentrado que es el ácido láctico se sometió a una prueba de caracterización para determinar la pureza del producto final.

3.4.6 Evaluación del rendimiento de ácido láctico

3.4.6.1 Acidez titulable.

El contenido de ácido láctico se evaluó por el método de acidez titulable expresada convencionalmente como gramos de ácido láctico por cada litro, con el método de ensayo de acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 13. El método aplicado consiste en la titulación de la muestra de volumen conocido en un matraz Erlenmeyer, se adicionan 3 gotas de la solución de fenolftaleína como indicador y se titula con una solución estandarizada de 0,1N de hidróxido de sodio previamente colocada en una bureta hasta un viraje de la solución a ligeramente rosado. Con base al % en masa de ácido láctico (A) y la densidad relativa del suero (d) se puede calcular los gramos de ácido láctico por cada litro del suero fermentado (g/L) aplicando la ecuación 4.

Ecuación 4: Acidez en gramos sobre litro (g/L).

$$Acidez = 10 * A * d$$

Donde:

d = densidad relativa del suero (g/cm³)

A = acidez titulable del suero de leche (%)

3.4.6.2 Medición del pH.

La determinación de pH se procedió con un pHmetro digital de sobremesa, una vez calibrado el potenciómetro con solución buffers requeridos, se sumergió en una muestra de 20 ml del concentrado sumergiendo hasta que se establezca el valor, la prueba se realizó por triplicado de cada unidad de estudio.

3.4.6.3 Densidad

Para medir la densidad se realizó el análisis gravimétrico por el método del picnómetro (AOAC962.37), con la muestra problema a temperatura ambiente (20°C), por triplicado. Se

pesó el picnómetro vacío en la balanza analítica, m_0 . Seguidamente, se llenó el picnómetro con agua destilada hasta rebosar y se pesó m_1 . Se esterilizó el picnómetro en la estufa durante 30 minutos a 105°C . Por último, se llenó el picnómetro con la muestra problema con ayuda de una jeringa y se pesó m_2 .

Ecuación 5: Densidad

$$\rho = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * \rho_{\text{H}_2\text{O}}$$

Donde:

ρ : Densidad

m_0 : masa del picnómetro vacío

m_1 : masa del picnómetro con agua

m_2 : masa del picnómetro con la muestra

$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$: densidad del agua.

3.4.7 Envasado

El ácido láctico resultante fue envasado en recipientes de vidrio previamente esterilizado para garantizar la conservación del producto.

3.4.8 Almacenado

La temperatura de conservación debe ser $<20^\circ\text{C}$ en espacios frescos protegido de la luz.

3.5 Procesamiento de datos

Para el registro de datos se utilizó la plantilla de Microsoft Excel y posterior análisis de resultados con el programa estadístico SPSS Statistics. Los resultados se analizaron con el Diseño en bloques completos al azar con dos factores independientes donde se comparó la variabilidad del factor tratamiento que es suero suplementado y la temperatura de fermentación, mediante técnica estadística de análisis ANOVA donde con la prueba F determinó si había diferencias significativas entre las medias con un intervalo de confianza de 95%. para comparar la varianza entre las medias de los tratamientos con un nivel de significancia de 0,05 aplicando la prueba Tukey.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados.

4.1.1 Análisis Físico-químico

A través de los análisis físico-químico del suero de la leche residuo de la fabricación del queso, se determinó los parámetros de buena calidad del producto

Tabla 5

Resultados del análisis físico-químico del suero de leche

Parámetros	Valor
Lactosa, %	4,79
Proteína Láctea, %	0,83
Grasa Láctea, %	0,05
Solidos totales %	6,48
Ceniza, %	0,62
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	0,16
Ph	6,4

De acuerdo a los análisis físico-químico del suero de leche se estableció como suero de leche dulce en el cual el contenido de lactosa con valores de 4,79%, proteínas 0,83% grasa láctea 0,05%, pH 6,4 y acidez titulable con 0,16%. definiendo como materia prima apto para su posterior proceso.

4.1.2 Análisis microbiológico

Los resultados se obtuvieron a través de conteo en las placas seleccionadas de colonias típicas y atípicas, calculando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por centímetro cubico de muestra.

Tabla 6

Resultados del análisis microbiológico del suero de leche en estudio

Microorganismos	Valores (UFC/g)
<i>Aerobios mesófilos.</i>	250
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia
<i>Staphylococcus Aureus.</i>	Ausencia
<i>Salmonella</i>	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia

Con respecto al análisis microbiológico se evidenció la presencia de 250 UFC/g, *Aerobios mesófilos*, mientras que los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, presentaron ausencia en todas las muestras, por consiguiente, el suero de leche se consideró apto como materia prima o como ingrediente para la aplicación en la industria alimentaria como suplemento dietético y para la elaboración de un subproducto.

4.1.3 Caracterización de ácido láctico.

4.1.3.1 Acidez titulable y medición de pH

La caracterización de los parámetros de acidez titulable y el pH, se realizó al producto concentrado, al mantener el volumen constante en el proceso de la destilación, obteniéndose los resultados de concentración de ácido láctico en g/L. El análisis se realizó por triplicado de cada grupo experimental donde los resultados fueron analizados estadísticamente. A continuación, se detallan la media de los resultados obtenidos.

Tabla 7

Resultados de acidez titulable y pH.

Tratamientos	Nomenclatura	Acidez titulable (g/L)	pH
T1	A ₀ B ₁	13,67	5,55
T2	A ₀ B ₂	14,80	4,89
T3	A ₁ B ₁	21,07	3,58

T4	A ₁ B ₂	23,29	3,09
T5	A ₂ B ₁	17,73	4,05
T6	A ₂ B ₂	19,29	3,93

Nota: A₀: Tratamiento control; A₁: Suplemento al 0,5%; A₂: Suplemento al 1,0%; B₁: 38°C; B₂: 43°C.

Factor A-B: difieren estadísticamente con $P < 0,05$

En base al análisis estadístico ANOVA (anexo 3), se observó diferencias significativas con $P < 0,05$ entre los tratamientos, para la variable suplemento como Factor “A” así también para la variable temperatura de fermentación como el Factor “B”. para la selección del mejor tratamiento se realizó prueba de Tukey donde se observó divididos en tres subconjuntos, con aquello se identificó con mayor producción en el T4 a partir de la fermentación de lactosuero suplementado con extracto de levadura y CaCO₃ al 0,5% y temperatura de fermentación de 43°C inoculado con *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*, con una producción de 23,29 g/L. de ácido láctico con respecto al tratamiento control que fue fermentado sin suplemento con resultado de 14,80 g/L. Por consiguiente, se evidenció que el extracto de levadura y CaCO₃ como suplemento aportó significativamente con fuente de nitrógeno estimulante en el crecimiento bacteriano en la fermentación láctica.

De acuerdo a los resultados estadísticos de pH, esto se pudo deducir que el mayor porcentaje de reducción de pH=3,09 alcanzó en el T4. Teniendo en cuenta lo anterior y contrastando los resultados obtenidos en la cuantificación de ácido láctico por acidez titulable, el mayor porcentaje de reducción de pH registrado coinciden con la mayor producción de ácido láctico obtenido en T4 con un total de 23,29 g/L de ácido láctico.

A continuación, se presenta las características físico-químicas del ácido láctico con los resultados del mejor tratamiento.

Tabla 8

Características físico-químicas de ácido láctico.

Características	Valor
Acidez titulable	2,27 %
Concentración	23,29 g/L
pH	3,09

Densidad	1,12 g/ml
Color	Amarillo transparente

El ácido láctico obtenido en cuanto al acidez titulable presenta una concentración de 23,29 g/L de ácido láctico, pH de 3,09 con una densidad de 1,12 g/ml y el color presentó un amarillo transparente y el valor de la densidad es el resultado del mejor tratamiento.

4.2 Análisis del beneficio/costo

Tabla 9: Costo de materia prima e insumos.

Insumos	Cantidad	Costo \$.
Lactosuero	5 L.	1,25
<i>Bacteria láctica</i>	1,0g.	0,25
Extracto de levadura	1,25g.	0,25
Carbonato de calcio	1,25g.	0,5
Total		2,25

Tabla 10: Costos de producción y precio de venta

COSTOS DE PRODUCCIÓN	
Materia prima directa	\$ 2,25
Mano de obra directa	\$ 50,00
Costos indirectos de fabricación	\$ 1,50
Total, costos de producción	\$ 53,75
Unidades producidas	60
Precio de venta unitario	\$ 0,90

Iva 12%	\$ 0,11
Utilidad	20%
Precio de venta al publico	\$ 1,23

Tabla 11: *Análisis beneficio/costo*

Tasa de descuento	12%
Flujo neto efectivo	\$73,64
VAN	\$65,75
Costo de producción	\$ 53,75
B/C	1,22

De acuerdo a la formulación del mejor tratamiento se estableció que el benéfico/costo del ejercicio fue de \$1,22 estableciendo que por cada dólar de inversión se obtienen 22 centavos de utilidad con una producción de 60 unidades con contenido neto de 50ml de ácido láctico.

4.3 Discusiones

4.3.1 Calidad de la materia prima

a. Físico-químico

El control de calidad del suero de leche en base a la composición físico-químico, visibilizó variaciones mínimas en porcentajes normales comparado con los valores establecidos por la Norma INEN 2594, estuvieron dentro de rango aceptable como requisito del suero de leche para su posterior procesamiento. Además, al comparar con estudios realizados por (Puente, 2017) donde el contenido de lactosa y el pH fueron similares con valores de 4,4% y 6,5 respectivamente. Sin embargo, al relacionar el resultado de proteína presentó 1,1% resultando mayor al valor obtenido en el suero lácteo de esta investigación, así también (Arroyo, 2019), en los resultados de la caracterización del lactosuero pasteurizado obtuvo una composición en lactosa de 2.08% y de proteína total de 0.46%. El pH del suero (6.8) lo define como un suero dulce. El contenido de lactosa de 2,08 es uno de los componentes principales que presentó el suero de leche. En este caso representa la principal

fuente de carbono para el metabolismo de la cepa de *Lactobacillus casei*, menciona el autor en sus resultados.

b. Microbiológico.

Al comparar con la NTE (INEN, 2011) para lactosuero líquido donde establece conteos menores a 30000 UFC/ml, se determinó que el nivel de calidad se encontró dentro de los parámetros establecidos. También los estudios realizados por (Santillan, 2015) como resultado del análisis microbiológico, presentaron ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*, al igual que el estudio realizado por (Cruz, 2018) donde se observó los conteos en placa de *Aerobios Mesófilos* en valores entre $4,36 \times 10^2$ UFC/ml y $6,90 \times 10^4$ UFC/ml. Las diferencias encontradas entre los resultados de esta investigación y los autores citados pueden estar asociadas a las condiciones ambientales, ordeño, como también la procedencia de la leche empleada para la fabricación del queso, la calidad inicial de la leche con la que se elabora el producto y el tipo de almacenamiento que se le da al suero resultante de la elaboración de queso, que son factores que afectan directamente a la composición y las características físico-químicas y microbiológicas del suero de leche.

4.3.2 Efectos de la suplementación y la temperatura de fermentación en la producción de ácido láctico.

En la producción de ácido láctico a partir del suero de leche inoculado con *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*, y suplementado con extracto de levadura, se evidenció una variación significativa en la producción de ácido láctico. Los resultados fueron similares a otras investigaciones como el de (Velasques, 2014) que reportó una producción de 21,91 g/L con un tiempo de fermentación de 108h a 37°C inoculado con *Lactobacillus Bulgaricus*, así también como el de (Montaño, 2016) con una producción de 36,7 g/L con un tiempo de fermentación de 72h utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Ambos autores trabajaron con mayor tiempo de fermentación, que pudo ser un factor importante para una mayor producción de ácido láctico. Así también (Betancourt, 2020) presentó el rendimiento más alto con una producción de 6,91% de ácido láctico, en las condiciones de 100µL de bacteria *Lactobacillus Bulgaricus* activada, tiempo de fermentación de 24h y a una temperatura de 37°C.

El uso de suplementos en la combinación de extracto de levadura y CaCO_3 con la bacteria láctica aportan una importante concentración de fuente de nitrógeno al medio estimulando en el desarrollo de bacterias y metabolitos primarios. El factor de dilución utilizado corresponde a T4 con el 0,5% de suplemento y B₂ 43°C valor de suplemento menor al factor de dilución al T5 y T6, pero a este valor el microorganismo utilizado demostró mejor aprovechamiento de los sustratos y conversión de ácido láctico con respecto al tratamiento control. Así mismo, (Cadena, 2021) se enfoca en el suplemento y menciona que se evidenció

que para las variables analizadas el mejor tratamiento fue T5 (suero dulce suplementado con sulfato de amonio y peptona y temperatura de 37 °, otro aspecto importante es la combinación con la temperatura (45 °C) reportada como óptima.

Tomando como referencia el pH inicial de 6,5 como se presenta en la tabla 8, el factor A₁ presentó una variación significativa de pH a 3,34, esto se debe a que el cultivo láctico con el suplemento y a una temperatura optima de crecimiento permitió la fermentación de la lactosa en ácido láctico. Suceso también reportado por (Betancourt, 2020), que inició con un pH de 6,5 y tuvo un descenso muy significativo a 2,32 en los tres métodos experimentales durante el tiempo de 24 horas y a una temperatura de fermentación de 37°C.

El ácido láctico obtenido en cuanto al color, el valor de pH y la densidad es similar al estudio realizado por (Flores, 2020), que presentó un color amarillo transparente y pH 3,1, las demás variables como, la concentración y el porcentaje de acidez titulable son diferentes con valores 31.65 g/l y 3,2% respectivamente, esto puede ser debido a que se necesitaría de un paso de purificación para aumentar la pureza como lo recomienda (Caiza, 2015).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Los principales factores que afectan la calidad en la composición fisicoquímica y microbiológica del lactosuero obtenido de la elaboración de queso se relacionan, muy posiblemente, con la calidad inicial de la leche con la que se elabora el producto y con el tipo de almacenamiento y manipulación que se le da al suero de leche, en este estudio se utilizó suero dulce con un pH inicial de 6,4 y 0,16 % de ácido láctico, en base a los análisis físico-químico y microbiológico se determinó valores que están dentro del rango permitido por la NTE INEN 2594 para la aceptación de lactosuero como materia prima.
- Se obtuvo ácido láctico del suero de leche mediante la homofermentación inoculado con *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*, en condiciones anaerobias donde las bacterias lácticas asimilan mejor su metabolismo por los aminoácidos esenciales que contiene el suero de leche que convierten la lactosa presente como sustrato en ácido láctico.
- Mediante la caracterización de ácido láctico se concluye que el suero de leche inoculado con *Lactobacillus delbrueckii subs. Bulgaricus* y *Streptococcus Thermophilus*, suplementado con extracto de levadura y CaCO_3 a una concentración de 0,5% y temperatura de fermentación de 43 °C, presentó una mejor concentración de 23,29 g/L de ácido láctico, el valor de pH presentó un descenso muy significativo a 3,09 que es uno de las propiedades físico químicas del ácido láctico.

5.2 RECOMENDACIONES

- Es necesario que los productores estandaricen los procesos de elaboración de queso y establezcan sistemas que garanticen las buenas prácticas de manufactura en el manejo de lactosuero, para así mantener la buena calidad de este residuo y obtener como materia prima o como ingrediente apto para su posterior procesamiento y no desechar.
- Implementar sistemas y métodos de obtención de ácido láctico mediante la fermentación láctica, para controlar el problema ambiental y económico generados por desecho en grandes cantidades de suero de leche.
- El ácido láctico antes de envasar debe ser pasteurizado para reducir los microorganismos patógenos presentes en el producto sin que esto afecte a las características propias del alimento.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Aragón, J. (2015). *EVALUACIÓN DE FUENTES ALTERNATIVAS DE NITRÓGENO EN FERMENTACIÓN LÁCTICA*. Obtenido de [/https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56343/1015410877.2016.pdf?sequence=1](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56343/1015410877.2016.pdf?sequence=1)
- Arroyo, C. M. (2019). *Industria Lactea*. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/9776/2/03%20EIA%20484%20TRABAJO%20GRADO.pdf>
- Betancourt, J. (2020). *Universidad Central del Ecuador*. Obtenido de Obtencion de acido lactico a partir del suero de leche: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22735/1/T-UCE-0017-IQU-109.pdf>
- Cadena, E. (2021). *Obtencion de acido lactico*. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11903/2/03%20EIA%20538%20TRABAJO%20GRADO.pdf>
- Caiza, M. (2015). Obtenido de Evaluacion de Acido Lactico: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2636/1/T-UTC-00172.pdf>
- Caiza, M. (2015). *Evaluacion de Acido Lactico*. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2636/1/T-UTC-00172.pdf>
- Castro, B. (Junio de 2017). *Estudio del Proceso de Purificacion de Acido Lactico*. Obtenido de [/http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/4881/FIQ-M-2017-0885.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/4881/FIQ-M-2017-0885.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- CIL. (2022). *Centro de la Industria Lactea del Ecuador*. Obtenido de <https://www.facebook.com/cilecuador.org/>
- Cisneros, A. (2022). *Universidad Central del Ecuador*. Obtenido de Beneficios de la utilización del suero de leche: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/28180/1/FCQ-CQA-CISNEROS%20ALISSON.pdf>
- Cruz, G. D. (18 de Diciembre de 2018). *Estudio de la Calidad fisico-quimico y microbiologico del Lactosuero*. Obtenido de [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/johanamorillo,+Estudio+de+la+calidad+f%C3%A1sicoqu%C3%ADmica+y+microbiol%C3%B3gica+del%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/johanamorillo,+Estudio+de+la+calidad+f%C3%A1sicoqu%C3%ADmica+y+microbiol%C3%B3gica+del%20(1).pdf)
- Denicia, E. V. (2009). *La industria de la leche y la contaminación del agua*. Obtenido de <https://elementos.buap.mx/post.php?id=314#:~:text=Las%20prote%C3%ADnas%20y%20la%20lactosa,la%20dbo%20del%20agua%20contaminada.>
- Flores, J. (2020). *Universidad Tecnica del Norte*. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11169/2/03%20EIA%20513%20TRABAJO%20GRADO.pdf>

- Gaviria, O. (2020). *UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA*. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/344723879.pdf>
- Gomez, I. (12 de Enero de 2018). *ACIDULANTES FUNDAMENTALES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA*. Obtenido de [https://www.agrolab.com/es/actualidades/1390-acidulantes-fundamentales-en-la-industria-alimentaria.html#:~:text=%C3%81cido%20%C3%A1ctico%20\(E%2D270\)&text=Pos ee%20una%20amplia%20gama%20de,de%20los%20dulces%20y%20pasteles](https://www.agrolab.com/es/actualidades/1390-acidulantes-fundamentales-en-la-industria-alimentaria.html#:~:text=%C3%81cido%20%C3%A1ctico%20(E%2D270)&text=Pos ee%20una%20amplia%20gama%20de,de%20los%20dulces%20y%20pasteles).
- Gómez, L. (Diciembre de 2019). *ÁCIDO LÁCTICO: UNA REVISIÓN SOBRE LOS MÉTODOS DE DETERMINACION Y PURIFICACION*. Obtenido de <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-AcidoLactico-7380551.pdf>
- Guamán, P. A. (2022). *Ingenieria Quimica*. Obtenido de Uso de acido lactico en la Industria cosmetica: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17719/1/96T00785.pdf>
- Herriman, M. (-- de -- de 2005). *Situacion actual y tendencias*. Obtenido de Acido lactico y polilactico: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659007>
- Huerta, L. (s.f). Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro . *Departamento de Tecnología de Alimentos*, 5.
- INEN, N. (2011). *Instituto Ecuatoriano de Normalizacion*. Obtenido de <n://efaidnbmnnnibpcajpcglclefinhttps%3A%2F%2Fwww.normalizacion.gob.ec%2Fbuzon%2Fnormas%2F2564.pdf&chunk=true>
- Johana, C. C. (2020). *Universidad Central del Ecuador*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22735/1/T-UCE-0017-IQU-109.pdf>
- Machado, A. (2019). *Revista tecnica de Facultad de ingenieria Universidad de Zulia*. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702007000100007#:~:text=El%20%C3%A1cido%20%C3%A1ctico%20es%20el,la%20glucosa%20en%20%C3%A1cido%20%C3%A1ctico.
- Martín, M. A. (2019). *Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales*. Obtenido de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/669678/TMABM1de1.pdf?sequence=2>
- Montaño, A. R. (Marzo de 2016). *Produccion de acido lactico a partir del lactosuero utilizando Lactobacillus Delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/301745653_PRODUCION_DE_ACIDO_LACTICO_A_PARTIR_DEL_LACTOSUERO_UTILIZANDO_LACTOBACILLUS_DELBRUECKII_SUBSP_BULGARICUS_Y_STREPTOCOCCUS_THERMOPHILUS
- Ortiz, F. H. (2018). *CONTROL Y REGULACIÓN DEL PH EN UNA FERMENTACIÓN LÁCTICA*. Obtenido de <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/view/1175#:~:text=El%20carbonato%20de%20calcio%2C%20aparte,soluble%20solo%20a%20un%20pH>

- Parra, R. A. (16 de Abril de 2009). *LACTOSUERO: IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
- Puente, J. F. (.. de Junio de 2017). *Obtencion de acido lactico a partir de suero de leche por proceso biofermentativo*. Obtenido de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17484/1/CD-7984.pdf>
- Requena, T. (2018). *Bacterias lácticas en la alimentación y en la salud*. Obtenido de <https://digital.csic.es/handle/10261/194782>
- Rivadeneira, M. Z. (2021). Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero:. *La Tecnica*, 39.
- Rodriguez, C. (24 de Noviembre de 2017). *Interciencia.net*. Obtenido de <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/11/712-CHAVEZ-42-11.pdf>
- Santillan, A. (.. de Septiembre de 2015). *Aprovechamiento del suero de leche*. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Hannibal-Brito-2/publication/315455479_APROVECHAMIENTO_DEL_SUERO_DE_LECHE_COMO_BEBIDA_ENERGIZANTE_PARA_MINIMIZAR_EL_IMPACTO_AMBIENTAL/links/58d0a947a6fdcc344b0c12e3/A
- UTPL. (31 de Diciembre de 2021). *Suero de leche un aliado para la Innovacion Alimenticia*. Obtenido de <https://noticias.utpl.edu.ec/suero-de-leche-un-aliado-para-la-innovacion-alimenticia#:~:text=En%20Ecuador%2C%20se%20generan%20cerca,fines%20comerciales%2C%20excepto%20para%20el>
- Velasques, Y. E. (2014). *Sintesis e acio lactico a partir del lactosuero utilizando Lactobacillus Bulgaricus*. Obtenido de <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/126/BC-TES-3852.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

7 ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica del fermento láctico.

Ilustración 2: Ficha técnica

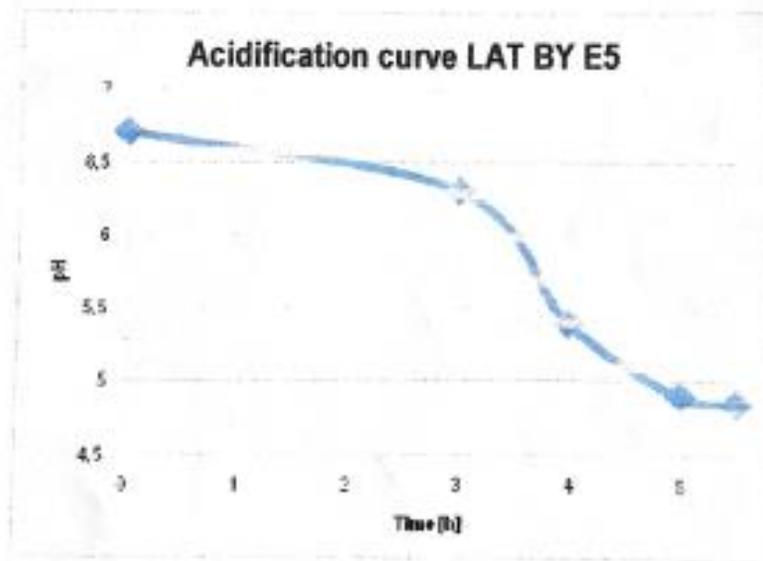


ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

CULTURA LEOFILIZADA YOGURT LAT BY E5®

<u>Información general</u>	: Cultura original de bacteria de ácido láctico definida thermophilic para producción de yogurt con propiedades de sabor mejoradas.
<u>Composición</u>	: Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus y Streptococcus Thermophilus.
<u>Aplicación</u>	: Para DVS aplicación directa. La cultura es apropiada para la producción de yogurt batido, con fruta o del tipo bebible.
<u>Modo de uso</u>	: Desinfecte el embalaje con etanol antes de la apertura, añada la cultura en condiciones asépticas y mezcle bien para la preparación.
<u>Embalaje</u>	: Bolsas de hoja de metal de aluminio. LAT BY E5/50 L, 100 L, 250 L, 500 L Aplicación DVS LAT BY E5/500 L, 1000 L, 2000 L
<u>Duración y almacenaje</u>	: 12 meses en -18 ° C
<u>Concentración de célula</u>	: Bacteria de ácido láctico - minuto. CFU 9,5 × 10 /g
<u>Datos Microbiológicos</u>	: Enterobacteriaceae :ausente en 1 g Levadura :ausente en 1 g Staphylococcus aureus :ausente en 1 g Salmonella :ausente en 25 g
<u>Recomendación para uso</u>	: Para obtener un producto de alta calidad final, recomendamos empezar a enfriar cuando se haya alcanzado un PH de 4,9-4,85

Ilustración 2: (continuación)



The quality of the culture is determined according to International Dairy Standards IDF 148: 1991; IDF 149 A: 1987; PL - IDF 73 B: 1990; PL - IDF 94 B: 1989; PL - IDF 145A: 1987; PL - IDF 83B: 1985 and standardized laboratory quality control tests established and contained in Lactis Ltd. The data obtained from the quality control laboratory tests should be used only as guidelines! However, in practice the results depend on the quality of raw material used, accuracy of the application of the instructions, type of product and technology used as well as strict observation of good production and microbiological practices.

Anexo 2: Procedimiento.

Ilustración 3: *Pasteurización del suero de leche.*

A



B



C



Interpretación: A: Pasteurización. B: Refrigeración. B: Filtrado.

Ilustración 4: *Análisis físico químico*

A



B



C



D



Interpretación: A: Análisis de grasa, proteína, lactosa. B: Adecuación de las muestras. C: Análisis de sólidos totales. D: Análisis de Cenizas en la mufla.

Ilustración 5: *Fermentación*

A



B



C



D



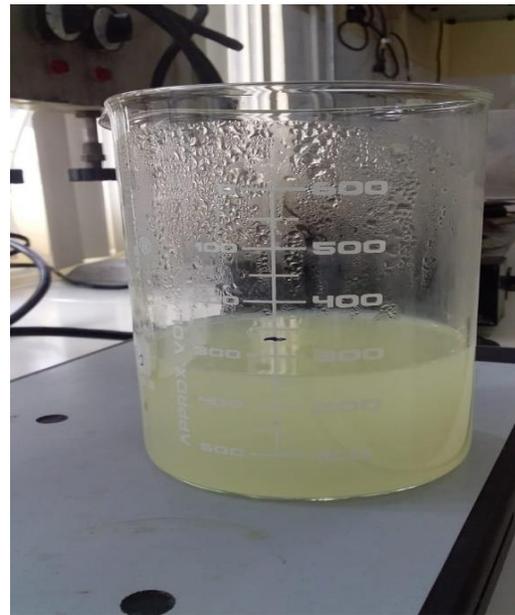
Interpretación: A. Pesaje de medio de cultivo y suplementos. B. Inicio de la fermentación a baño maría. C: Caldos en forma de lactato de calcio. D: Refrigeración.

Ilustración 6: *Extracción de Ácido Láctico*

A



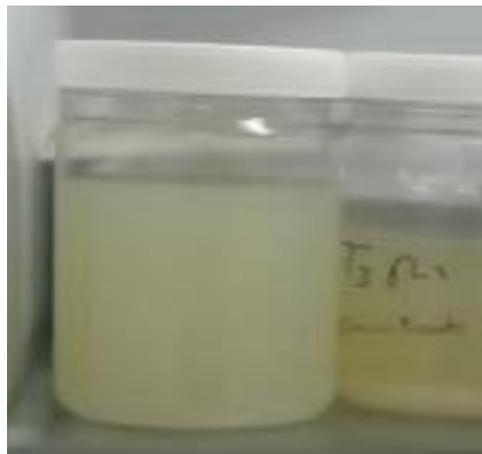
B



C



D



Interpretación: A: Filtrado al vacío. B: Evaporación con agitación. C: Destilación al vacío. D: Producto concentrado.

Ilustración 7: Caracterización de ácido láctico por Acidez Titulable y Prueba de pH.

A



B



Interpretación: A: Titulación con Hidróxido de sodio y fenolftaleína como indicador. B: Medición de pH de ácido láctico.

Anexo 3: Análisis estadísticos

Acidez titulable.

Tabla 12:

Matriz de datos de resultados de acidez titulable

Suero suplementado	Temperatura de fermentación					
	38°C			43°C		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	13,79	13,50	13,73	14,89	14,80	14,71
A1	20,82	20,29	20,10	23,23	23,23	23,41
A2	17,76	17,67	17,76	19,24	19,34	19,29

Nota: los valores están expresados en gramos de ácido láctico por cada litro (g/L) del suero de leche.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el Diseño en bloques completos al azar con dos factores independientes donde se comparó la variabilidad del factor tratamiento que es suero suplementado en diferentes concentraciones, el factor temperatura de fermentación detallado en bloques y la variable de respuesta es el ácido láctico en g/L.

Tabla 13

Descripción de los resultados entre factores

Temperatura de Fermentación * Suero Suplementado					
Variable dependiente: Ácido Láctico					
Temperatura de Fermentación	Suero Suplementado	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
38°C	Control	13,673	,076	13,508	13,838
	A ₁	21,070	,076	20,905	21,235

	A ₂	17,730	,076	17,565	17,895
	Control	14,800	,076	14,635	14,965
43°C	A ₁	23,290	,076	23,125	23,455
	A ₂	19,290	,076	19,125	19,455

Nota: Los resultados de la Media están expresados en(g/L).

Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p < 0,05$. De acuerdo a los resultados se observó la acción de los suplementos en el sustrato que mejoró el metabolismo celular de las bacterias lácticas con respecto al tratamiento control. Con respecto a la temperatura de fermentación también se observó una variación entre los resultados.

Análisis de varianza ANOVA

Tabla 14

Análisis de varianza (ANOVA) Acidez titulable.

Pruebas de los efectos inter – sujetos					
Variable dependiente: Ácido Láctico g/L					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	202,601 ^a	5	40,520	2350,508	,000
Intersección	6033,877	1	6033,877	350015,448	,000
Temperatura de Fermentación	12,038	1	12,038	698,287	,000
Suero Suplementado	189,654	2	94,827	5500,750	,000
Temperatura de Fermentación * Suero Suplementado	,909	2	,455	26,376	,000
Error	,207	12	,017		

Total	6236,685	18
Total corregida	202,808	17

a. R cuadrado = ,999 (R cuadrado corregida = ,999)

Dado que el valor p para temperatura de fermentación y suero suplementado son menores que 0.05, esto nos dice que ambos factores tienen un efecto estadísticamente significativo en los resultados. Así mismo que para el efecto de interacción entre factores nos dice que existe un efecto de interacción significativo.

Tabla 15

Prueba estadística de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Residuo para Ácido Láctico.	0,127	18	0,200*	0,973	18	0,847

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

De acuerdo a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, el $p = 0,847$ que es mayor a 0,05, en consecuencia, esto demostró que los datos del análisis de ácido láctico por acidez titulable tienen una distribución normal, por consiguiente, se realizó pruebas paramétricas.

Comparaciones múltiples

Luego del análisis de varianza se confirmó que existió diferencias significativas entre los datos, por lo tanto, se realizó comparaciones múltiples basado en método de Tukey conocido también como método de la diferencia honestamente significativa de Tukey, se utilizó un sólo factor con el cual se comparó todos los posibles pares de medias entre grupos.

Tabla 16

Prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Ácido Láctico

DHS de Tukey

(I)Suero Suplementado	(J)Suero Suplementado	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	A ₁	-7,9433*	,07580	,000	-8,1456	-7,7411
	A ₂	-4,2733*	,07580	,000	-4,4756	-4,0711
A ₁	Control	7,9433*	,07580	,000	7,7411	8,1456
	A ₂	3,6700*	,07580	,000	3,4678	3,8722
A ₂	Control	4,2733*	,07580	,000	4,0711	4,4756
	A ₁	-3,6700*	,07580	,000	-3,8722	-3,4678

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,017.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

La comparación múltiple entre factores evidenció la diferencia de medias que presentó entre todos los grupos con valor de significancia < 0,05, entonces ningún factor fue igual, por consiguiente, se determinó que los resultados de los tratamientos tuvieron una diferencia significativa.

Prueba Tukey para acidez titulable

Tabla 17

Prueba de Tukey para comparaciones por subconjuntos homogéneos entre grupos

		Ácido Láctico g/L		
		DHS de Tukey ^{a,b}		
Suero Suplementado	N	Subconjunto		
		1	2	3

A ₀ Control	6	14,2367		
A ₂	6		18,5100	
A₁	6			22,1800
Sig.		1,000	1,000	1,000

b. Alfa = ,05.

En base a la prueba de Tukey por subconjuntos se identificó el mejor tratamiento basadas en las medias observadas en el factor A₁ con una concentración de 0,5% de suplemento con mayor producción con un valor medio de 22,18 g/L de ácido láctico,

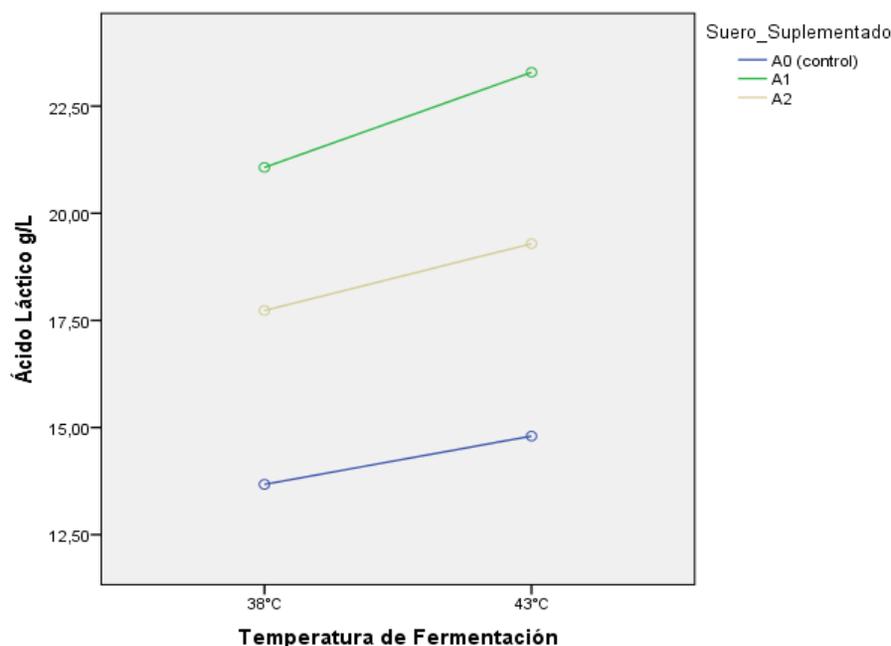


Ilustración 8: Acidez titulable con respecto a la temperatura de fermentación.

Además, se visualizó mediante la gráfica de medias marginales estimadas donde indica la concentración de A.L en g/L con respecto a la temperatura de fermentación, por consiguiente, promedio de cada combinación entre factores, a mayor temperatura es mayor la producción de ácido láctico, que presentó a 43°C de temperatura de fermentación.

Medición de pH

Tabla 18*Matriz de datos de los resultados de pH.*

Suero suplementado	Temperatura de fermentación					
	38°C			43°C		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	5,12	5,10	5,11	5,01	5,03	5,02
A1	3,97	3,98	3,95	3,85	3,88	3,86
A2	4,19	4,18	4,19	4,08	4,10	4,09

Análisis estadístico**Tabla 19***Estadístico Descriptivo de la medición del pH*

Variable dependiente: pH					
Suero Suplementado	Temperatura Fermentación	Media	Desviación típica	N	
Control	38°C	5,5567	,02082	3	
	43°C	4,8967	,07234	3	
	Total	5,2267	,36462	6	
A ₁	38°C	3,5833	,03606	3	
	43°C	3,0900	,07638	3	
	Total	3,3367	,27544	6	
A ₂	38°C	4,0567	,02082	3	
	43°C	3,9300	,07000	3	

	Total	3,9933	,08335	6
	38°C	4,2344	1,07664	9
Total	43°C	4,1367	,59281	9
	Total	4,1856	,84462	18

Tabla 20

Análisis de varianza ANOVA de pH.

Variable dependiente: pH					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	12,091 ^a	5	2,418	800,165	,000
Intersección	315,340	1	315,340	104340,360	,000
Suero Suplementado	11,049	2	5,524	1827,934	,000
Temperatura Fermentación	,043	1	,043	14,235	,003
Suero Suplementado * Temperatura Fermentación	1,000	2	,500	165,360	,000
Error	,036	12	,003		
Total	327,467	18			
Total corregida	12,128	17			

a. R cuadrado = ,997 (R cuadrado corregida = ,996)

El nivel de significancia de los resultados del pH de ácido láctico, es menor al valor alfa de 0,05. Para el suplemento el valor de $p < 0,001$, Para temperatura de fermentación el valor de $p = 0,003$,

Tabla 21*Prueba de normalidad con los datos de pH*

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Residuo para pH	,134	18	,200*	,958	18	,565

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

De acuerdo a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, el $p = 0,565$ que es mayor a nivel de significancia de 0,05, en consecuencia, se aceptó la hipótesis nula y se rechazó la hipótesis alternativa, esto demostró que los datos del análisis de ácido láctico por medición de pH tienen una distribución normal, por consiguiente, se realizó pruebas paramétricas.

Comparaciones múltiples

Se realizó comparaciones múltiples basado en método de Tukey conocido también como método de la diferencia significativa de Tukey, se utilizó un sólo factor con el cual se comparó todos los posibles pares de medias entre grupos, con un intervalo de confianza de 95%.

Tabla 22*Comparaciones múltiples con prueba de Tukey*

Variable dependiente: pH						
DHS de Tukey						
(I)Suero Suplementado	(J)Suero Suplementado	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	A ₁	1,8900*	,03174	,000	1,8053	1,9747

	A ₂	1,2333*	,03174	,000	1,1487	1,3180
A ₁	Control	-1,8900*	,03174	,000	-1,9747	-1,8053
	A ₂	-,6567*	,03174	,000	-,7413	-,5720
A ₂	Control	-1,2333*	,03174	,000	-1,3180	-1,1487
	A ₁	,6567*	,03174	,000	,5720	,7413

Al realizar la comparación entre los grupos del factor “A” se evidenció que existió diferencias muy significativas donde los valores de nivel de significancia $p < 0,001$ en todos los casos.

Prueba de Tukey para pH

Tabla 23

prueba de Tukey del pH en subconjuntos

		pH		
		DHS de Tukey ^{a,b}		
Suero Suplementado	N	Subconjunto		
		1	2	3
A ₁	6	3,3367		
A ₂	6		3,9933	
Control	6			5,2267
Sig.		1,000	1,000	1,000

A través de la prueba de Tukey, se evidenció que ningún grupo experimental es igual, se formó tres subconjuntos con los factores A₁, A₂ y el tratamiento Control con valores de pH 3,33; 2,99 y 5,23 respectivamente.

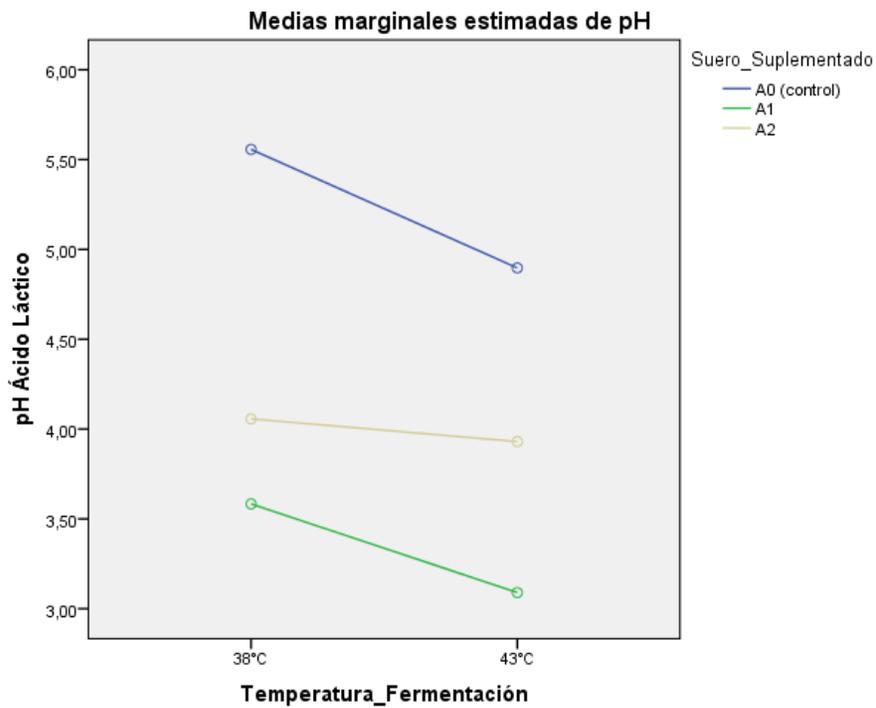


Ilustración 9: Resultados de pH con respecto a la temperatura

En la gráfica se observa que hay un descenso progresivo del valor de pH en función a la temperatura de fermentación, a 43°C se evidenció mayor descenso de pH.