



UNIVERSIDAD NACIONAL
"PEDRO RUIZ GALLO"
FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA
E INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA

**"SÍNTESIS DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE
LACTOSUERO DESPROTEINIZADO UTILIZANDO
LACTOBACILLUS BULGARICUS AISLADO DEL
YOGURT"**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA
OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

INGENIERO QUIMICO

POR:

YANINA DEL MILAGRO ENEQUE MANAYAY

LUIS LEONEL VELASQUEZ MILLONES

**LAMBAYEQUE PERU
2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL

"PEDRO RUIZ GALLO"

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
E INDUSTRIA ALIMENTARIAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA QUÍMICA



**"SÍNTESIS DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE
LACTOSUERO DESPROTEINIZADO UTILIZANDO
LACTOBACILLUS BULGARICUS AISLADO DEL
YOGURT"**



TESIS

UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"
OFICINA CENTRAL DE BIBLIOTECA PROCESOS TECNICOS
Nº DE INGRESO:
COD. DE CLASIFICACIÓN:

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA
OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

INGENIERO QUÍMICO

POR:

**YANINA DEL MILAGRO ENEQUE MANAYAY
LUIS LEONEL VELASQUEZ MILLONES**

**LAMBAYEQUE - PERÚ
2014**

**“Síntesis De Ácido Láctico A Partir De Lactosuero Desproteínizado
Utilizando Lactobacillus Bulgaricus Aislado Del Yogurt”**

TESIS

**Presentada como requisito para
optar el título profesional de**

INGENIERO QUIMICO

por

**YANINA DEL MILAGRO ENEQUE MANAYAY
LUIS LEONEL VELASQUEZ MILLONES**

**Sustentada y aprobada ante el
siguiente jurado**

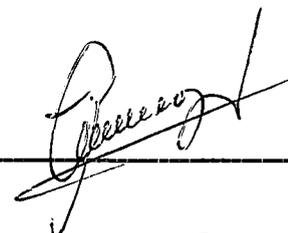
**Ing. M.Sc. Doyle Isabel Benel Fernández
Presidente**



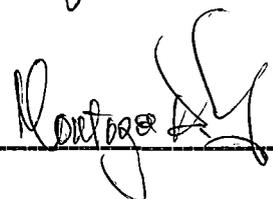
**Ing. M.Sc. Ronald Alfonso Gutiérrez Moreno
Secretario**



**Ing. Rodolfo Pastor Tineo Huancas
Vocal**



**Ing. M.Sc. Cesar Augusto Monteza Arbulú,
Asesor**



A Dios

Ante todo es necesario empezar esta redacción agradeciendo al todopoderoso no solo por la vida y la salud, sino también por permitir culminar nuestra carrera universitaria, darnos sabiduría y motivación para realizar este proyecto, pues sin él, esto no sería posible, y por permitirnos caminar por su sendero....

A mis padres

Por su apoyo incondicional, su amor, su comprensión y consejos en cada etapa de mi vida, por ser un ejemplo de esfuerzo y superación para mi vida.

Yanina del Milagro

A mis padres y hermanos

Empezar por su constante apoyo y la paciencia suficiente para conmigo, además y más importante la iniciativa moral que me inculcan, pues a ellos va este servicio.

Luis Leonel

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor el ingeniero Cesar Monteza Arbulu, guía en la elaboración y corrección de nuestro proyecto de tesis.

Al Lic. Mario C. Moreno Mantilla y a su colaboradora sarhy de la Facultad de ciencias biológicas de la UNPRG por su apoyo en facilitarnos el aislamiento de la bacteria,

Al Jefe Oficina Central de Investigación de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo

Dr. Carlos E. Villanueva Aguilar por el apoyo en la fermentación anaeróbica.

Al ingeniero Miguel Ángel Solano por su motivación e ideas que fueron benéficas.

A los técnicos de la Facultad de Ingeniería Química el Sr. Minga y Sr. Floriano, por habernos habilitado los materiales e instrumentos para poder realizar nuestros ensayos.

Los Autores



INDICE

N° Cap.	Título del Capítulo	N° Pág.
	RESUMEN	11
1	INTRODUCCIÓN	14
2	MARCO TEORICO	17
	2.1. Lactosuero.....	18
	2.2. Lactosa	20
	2.3. Acido Lactico.....	24
	2.4. Bacteria Acido Lacticas.....	27
	2.5. Fermentacion Lactica	31
3	MATERIALES Y MÉTODOS	33
	3.1. Localización y Duración	34
	3.2. Población y muestra de estudio.....	34
	3.3. Materiales	34
	3.4. Metodología Experimental.....	35
	3.5. Variables de estudio	41
	3.6. Análisis estadísticos.....	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
	4.1. Produccion de lactosa cristalizada por cada muestra de suero de leche	43
	4.2. Promedio y Desviacion estandar de lactosa por cada litro de suero de leche.....	45
	4.2. Análisis de Varianza de la lactosa cristalizada	47
	4.3. Porcentaje de Produccion de Acido Lactico	48
	4.4. Análisis de Varianza del acido lactico	55
5	CONCLUSIONES	56
6	RECOMENDACIONES	58
7	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	60
8	APÉNDICE	65
9	ANEXOS.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla	Título de la tabla	N° Pág.
01	Medidas de rendimiento de lactosa cristalizada según el volumen final de suero de leche.....	45
02	Análisis de varianza para determinar la productividad de lactosa según los volúmenes finales.....	47

ÍNDICE DE GRAFICOS

N° Grafico	Título del gráfico	N° Pág.
01	Gráfico de barras de Promedios de gramos de lactosa según concentraciones finales a partir de 100 ml de suero de leche.....	44
02	Gráfico de barras de Promedios del rendimiento de lactosa según concentraciones finales de suero de leche a partir de un litro.....	46
03	Grafico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la Muestra 1.....	49
04	Grafico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la Muestra 2.....	50
05	Grafico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la Muestra 3.....	51
06	Grafico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la Muestra 4.....	52
07	Grafico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la Muestra 5.....	53
08	Grafico de las diferencia de los porcentajes de acidez según el tiempo de fermentación de las 5 muestras	54

ÍNDICE DE APENDICE 1

N° Apéndice	Título del apéndice	N° Pág.
01	Cálculos Estadísticos	66
02	Cálculos Estadísticos	75

ÍNDICE DE TABLAS DEL APENDICE 1

N° Tabla	Título de la tabla	N° Pág.
01	Datos del primer ensayo.....	66
02	Datos del segundo ensayo	66
03	Datos del tercer ensayo.....	67
04	Datos del cuarto ensayo.....	67
05	Datos del quinto ensayo.....	68

ÍNDICE DE CUADROS DEL APENDICE 1

N° Cuadro	Título del cuadro	N° Pág.
01	Evaluación organoléptica.....	69
02	Rendimiento de Lactosa por cada muestra	70
03	Rendimiento de Lactosa por litro de suero de leche.....	71
04	Máximo y mínimo rendimiento de lactosa por cada concentración final de suero de leche.....	72

ÍNDICE DE TABLAS DEL APENDICE 2

N° Tabla	Título de la tabla	N° Pág.
01	Datos del primer ensayo.....	75
02	Datos del segundo ensayo.....	77
03	Datos del tercer ensayo.....	78
04	Datos del cuarto ensayo.....	79
05	Datos del quinto ensayo.....	80
06	Datos del sexto ensayo.....	81
07	Datos del séptimo ensayo.....	82
08	Datos del octavo ensayo.....	83
09	Datos del noveno ensayo.....	84
10	Datos del decimo ensayo.....	85
11	Datos del decimo primero ensayo.....	86
12	Datos del decimo segundo ensayo.....	87
13	Datos del decimo tercer ensayo.....	88
14	Datos del decimo cuarto ensayo.....	89
15	Datos del decimo quinto ensayo.....	90

ÍNDICE DE CUADROS DEL APENDICE 2

N° Cuadro	Título del cuadro	N° Pág.
01	Fermentación de la Muestra 1.....	91
02	Fermentación de la Muestra 2.....	92
03	Fermentación de la Muestra 3.....	93
04	Fermentación de la Muestra 4.....	94
05	Fermentación de la Muestra 5.....	95

06	Porcentajes de acidez de los 6 últimos ensayos de cada muestra.....	96
-----------	--	-----------

ÍNDICE DE ANEXOS

N° Anexo	Título del anexo	N° Pág.
01	Aislamiento de Lactobacillus Bulgaricus.....	103
02	Artículo de la bacteria.....	106
03	Fotos de la Parte Experimental	108
04	Tabla estadística	117

RESUMEN

Se presenta el estudio de dos alternativas para el aprovechamiento del lactosuero desechado de las industrias queseras de Lambayeque, dos alternativas relacionadas como son la producción de lactosa cristalizada y producción de ácido láctico previo a una fermentación anaeróbica.

Las muestras de suero de leche se obtuvieron a través de la colaboración de algunas industrias lácteas de la región Lambayeque que proporcionaron suero de diferentes tipos de quesos producidos en las mismas. El muestreo se realizó al azar, analizando todas las muestras que se obtuvieron.

Posteriormente, se aisló la lactosa presente en las diferentes muestras de suero, tomando 5 muestras de 100 ml cada uno para su posterior cristalización, siguiendo una metodología la cual solo varía la etapa de concentración hasta volúmenes finales de 10, 15, 20, 30 % y una muestra sin concentrar, resultando la muestra con la concentración final de 15% de mejor aceptación por su mayor productividad y presentar mejores características, finalmente se caracterizó la misma por medio de la prueba de azúcares reductores con los reactivos de Fehling y Benedict, confirmando así que la muestra recuperada era lactosa.

Los valores obtenidos de lactosa cristalizada de la muestra del suero concentrada al 15% están en el rango entre 8.9 y 9.6% con un promedio general de 9.36%.

Para la obtención de ácido láctico, la lactosa cristalizada fue previamente hidrolizada y suplementada con 7.5 g/l de extracto de levadura y 12 g/l peptona tripsica de caseína, se procedió a la fermentación utilizando la bacteria *Lactobacillus Bulgaricus* en un biorreactor columna de burbujeo a una T° de 34° C, analizando el porcentaje de acidez cada 12 horas, hasta lograr una acidez constante de 2.14% a las 108 horas. Por consiguiente se sintetizó ácido láctico a partir de lactosuero desproteinizado utilizando *Lactobacillus Bulgaricus*, produciendo 46 ml de ácido láctico a partir de 93 gramos de lactosa cristalizada por litro de lactosuero. De esta manera utilizando este método se

obtuvo grandes resultados a comparación con los métodos convencionales
(Fermentación a partir del suero puro).

ABSTRAC

Study two alternatives to the use of the discarded whey cheese industries of Lambayeque, two alternatives are related as the production of crystallized lactose and lactic acid production prior to anaerobic fermentation is presented.

The whey samples were obtained through the cooperation of some dairies that provided Lambayeque serum of different types of cheeses produced in them. Sampling was done randomly, analyzing all the samples were obtained.

Subsequently, the lactose present in the different serum samples was isolated by taking five samples of 100 ml each for subsequent crystallization, following a methodology which only varies the concentration step to final volumes of 10, 15, 20, 30% and a sample without concentrating, resulting in a final sample concentration of 15% of better acceptance by higher productivity and provide better features, finally it was characterized by means of the test of reducing sugars with Fehling and Benedict reagents, confirming so the specimen was recovered lactose.

The obtained values of the sample crystallized lactose concentrated serum of 15% are in the range between 8.9 and 9.6% with an overall average of 9.36%.

To produce lactic acid, the crystallized lactose was previously hydrolyzed and supplemented with 7.5 g / l yeast extract and 12 g / l peptone, tryptic casein proceeded to the fermentation using the lactobacillus bacteria bulgaricus in a bioreactor bubble column at T ° 34 ° C, analyzing the percentage of acid in 12 to constant acidity of 2.14% for 108 hours. Overall there was 46 ml of lactic acid from lactose crystallized 93 grams per liter of whey. Concluding that we can synthesize lactic acid from deproteinized whey using Lactobacillus bulgaricus getting great results compared to conventional methods.

CAPITULO I: INTRODUCCION

La preocupación pública por el control de la contaminación ambiental ha incitado la búsqueda de la más conveniente, económica y eficiente forma de aprovechamiento de los subproductos de la industria láctea, antes de ser desechados

En la actualidad, en el departamento de Lambayeque, el suero producido de la fabricación de quesos se desperdicia en un gran porcentaje. Al utilizar este suero, para la obtención de otros productos como son la lactosa y ácido láctico, se podría suplir la demanda interna de la región de estos productos, provocando el aumento del Producto Interno Bruto de la zona, debido a que actualmente se importa gran cantidad de lactosa y ácido láctico, sus sales y sus ésteres. Debido a que esta propuesta promueve el aumento de la explotación de recursos en Lambayeque.

En muchos países desarrollados, el suero de leche es utilizado ampliamente en diversos productos de alto valor agregado. En nuestro país, a lo más se utiliza como alimento para ganado porcino y vacuno, a una rentabilidad no favorable para la industria láctea.

El suero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, es el residual obtenido de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa como suero líquido.

Debido a esto, el lactosuero se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes, tales como: la lactosa (4 - 10%) y proteínas (0,32 - 0,7%), que constituyen fuentes potenciales para la alimentación humana; sin embargo, sólo una parte del suero se utiliza para estos fines, ya que la mayor parte del lactosuero se convierte en un efluente altamente contaminante cuando se vierte a los cuerpos de agua, debido a su gran demanda biológica y química de oxígeno(MARWAHA, S.S.,1988)

Los procesos de bioconversión surgen como una alternativa para el aprovechamiento de este desecho para producir lactosa y como sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de producir sustancias, como el ácido láctico, ampliamente usado en la industria alimenticia, textil, farmacéutica y cosmética.

Entre los microorganismos empleados para la producción de ácido láctico, el *Lactobacillus Bulgaricus*, consume los nutrientes presentes en el suero, principalmente la lactosa, produciendo además del ácido láctico pequeñas trazas de productos volátiles como ácido acético y dióxido de carbono, siendo capaz de convertir el 85 % de la fuente de carbono suministrada en ácido láctico (BROCK, T.D,1991).

La producción de ácido láctico y la determinación de los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus Bulgaricus* en cultivo continuo utilizando la lactosa del suero de leche como sustrato son los principales objetivos de esta investigación.

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1 LACTOSUERO

2.1.1 Definición

El lactosuero es la fracción de leche que no precipita por acción del cuajo o por la acción de ácidos durante la elaboración de queso. La mayor parte del agua contenida en la leche se concentra en el suero y en ella se encuentran todas las sustancias solubles, como la lactosa, proteínas solubles y algo de grasa.

La composición del lactosuero depende no solamente de la composición de la leche empleada y el contenido de humedad del queso sino, de manera muy significativa, del PH al que el lactosuero se separa de la cuajada. Así, se pueden distinguir dos tipos de lactosuero en función de que su acidez sea superior o inferior a 18 grados Dornic ($^{\circ}\text{D}$)($\text{ml NaOH N/9/100ml lactosuero}=1^{\circ}\text{D}= 0.01\%$ ácido láctico)

2.1.2 Tipos de lactosuero

➤ **Sueros ácidos:** se producen en su mayor parte en la fabricación de caseína por la incorporación de un ácido, normalmente un ácido acético, que produce su coagulación. La otra producción, minoritaria, procede de la coagulación de la caseína mediante la siembra de bacterias lácticas en la fabricación de quesos de pasta fresca y blanda.

➤ **Sueros Dulces:** se obtiene en la elaboración de quesos de pasta, utilizando para la coagulación cuajo, quimosina o cuajos de hongos o vegetales.

El lactosuero representa del 80 al 90% del volumen total de la leche que se utiliza en el proceso de elaboración de queso y contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche original. En el cuadro 1 se muestra la composición media del lactosuero ácido y dulce. Se observa que el componente mayoritario del lactosuero es agua (93.5%), pero presenta una cantidad importante de materia orgánica (lactosa y proteínas principalmente).

cuadro 1. Composición del lactosuero (promedios por 100 g).

	Agua	Lactosa	Materias			Ácido láctico
			Nitrogenadas	Grasas	Minerales	
Suero dulce	93.5	4.5	0.9	0.3	0.6	0.2
Suero ácido	93.5	4.0	1.0	0.1	0.8	0.6-1.0

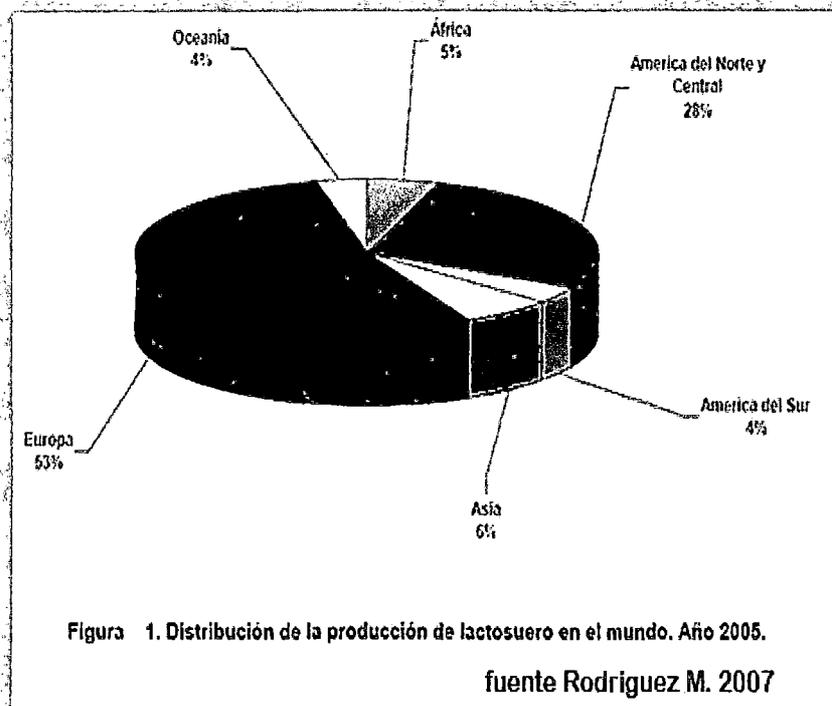
fuelle Rodriguez M. 2007

Cuadro 2. Composición típica del suero dulce y ácido

Componentes	Suero dulce (g/L)	Suero ácido (g/L)
Sólidos Totales	63-70	63-70
Lactosa	46-60	44-46
Proteínas	6-10	6-8
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fósforo	1-3	2-4.5
Lactato	2	6.4
Cloruro	1.1	1.1

fuelle (Jelen, 2003).

La producción de lactosuero es muy elevada. Por término medio, por cada kg de queso fabricado se obtiene de 9 a 12 litros de lactosuero (Sandoval 2005), dependiendo del tipo de queso y de la cantidad de agua utilizada durante el proceso. Teniendo en cuenta la proporción más desfavorable (9lt lactosuero/kg de queso producido) y los datos de producción mundial de queso (FAOSTAT), la producción mundial de lactosuero en el 2005 fue de $1.6 \cdot 10^{11}$ lt.

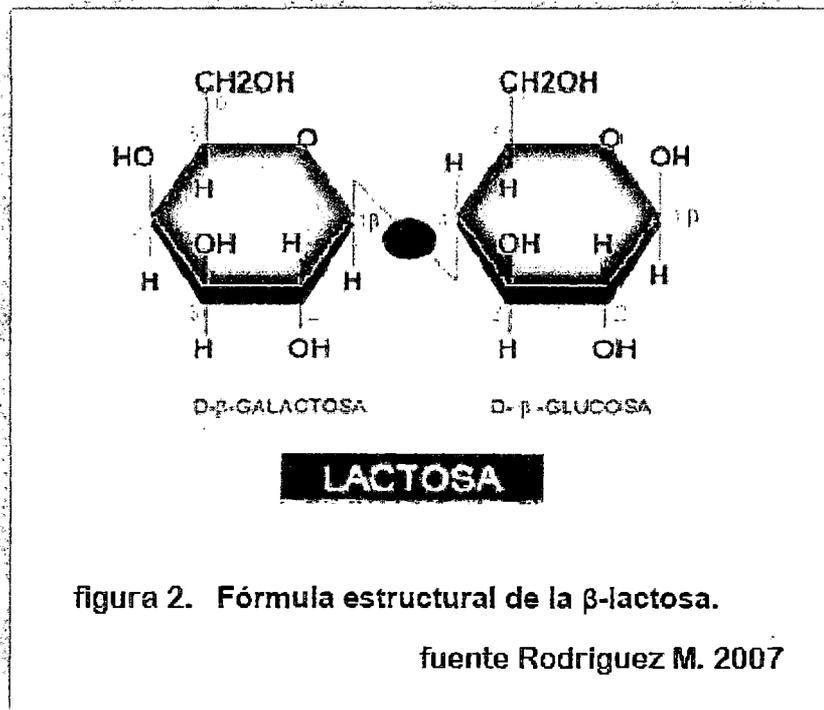


- Según el presidente de sierra exportadora (Alfonso Felipe Velásquez Tuesta) informo que el Perú produce 20 mil toneladas de queso al año, esto es una producción de 80 mil toneladas de lactosuero. (<http://www.sierraexportadora.gobierno.pe/nosotros/directorio-de-funcionarios>)

2.2 LACTOSA

2.2.1 Definición

La lactosa (4-0-β-D- galactopiranosil-D-glucopiranososa) solo se encuentra en las leches, es el principal hidrato de carbono de estos alimentos y está considerado por algunos autores como el único, sin embargo, también se encuentran pequeñas cantidades de glucosa (7.4 mg/100ml), galactosa (2 mg/100 ml), sacarosa, cerebrósidos y aminoazúcares derivados de la hexosamina. A pesar de que estos últimos están en concentraciones muy bajas, llegan a ejercer una influencia importante en la estabilidad de la leche, sobre todo cuando ésta ha sido sometida a tratamientos térmicos intensos.



CUADRO 3. Propiedades físicas de la lactosa

	Isómeros de la lactosa	
	α	β
Poder rotatorio	+89	+35
Temperatura de fusión	202°C	252°C
Concentración de equilibrio a 15° C	38%	62%
Cristalización de las soluciones saturadas: Por encima de 94°C	-	β -anhidra
Por debajo de 94°C	α -hidratada	-
Solubilidad a 15°C (g/100 g de agua)	7	50
Solubilidad a 100°C (g/100 g de agua)	70	95

Fuente: www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r18960.DOC

La lactosa se sintetiza en la glándula mamaria por un sistema enzimático en el que interviene la α -lactalbúmina, para después segregarse en la leche: tiene aproximadamente 15% del poder edulcorante de la sacarosa y contribuye, junto con las sales, al sabor global de este alimento.

Este disacárido está integrado por la condensación de una molécula de galactosa y otra de glucosa mediante un enlace glucosídico β (1,4); existen en dos formas isoméricas α y β , que se diferencian por sus propiedades físicas (véase en el cuadro 3). Teóricamente, ambas pueden presentarse hidratadas o anhidras; sin embargo, las más estables son la α -hidratada y la β -anhidra. Cabe indicar que en una solución de lactosa siempre se tiende al equilibrio entre ambas formas, pero generalmente siempre hay más β que α , ya que la primera es más soluble en agua.

La producción de ambos isómeros se lleva a cabo por la cristalización controlada de una solución saturada del disacárido; si este proceso se efectúa a $< 93.5^\circ \text{C}$ se produce la α -hidratada que tiene un cristal duro y es la de mayor tamaño ($> 0.02 \text{ mm}$); si la temperatura es superior a 93.5°C se obtiene la β -anhidra en forma de pequeñas agujas ($< 0.01 \text{ mm}$) que son más solubles y dulces que la anterior. Comercialmente, la lactosa cristalina se encuentra como α -hidratada pero esta se convierte en β al disolverse en agua ya que se presenta la mutarrotación.

Su cristalografía es muy importante puesto que de ella depende la estabilidad de muchos lácteos, sobre todo los que contienen una concentración alta del disacárido.

Como ya dijimos, en la leche siempre existe un equilibrio entre la lactosa α -hidratada y la β -anhidra y sus concentraciones dependen de la temperatura: mientras más baja sea más se favorecerá α cuya solubilidad es menor que la de la β ; en el cuadro 3 se observa que a 15°C la α es soluble solo al 7%, mientras que la β lo es en 50%, y que la primera se produce en 38% y la segunda en 62%, con lo que se establece dicho equilibrio. La lactosa se encuentra en la leche en una concentración de aproximadamente 4.7% lo que está lejos de ser una

solución saturada; sin embargo en las leches evaporadas y concentradas, que contienen el doble de lactosa (9.7% por eliminación de agua) o en las condensadas azucaradas, se tienen sistemas muy cercanos a la saturación del disacárido.

Cuando se almacena a bajas temperaturas la leche evaporada, se provoca la cristalización de la α -hidratada; si esto ocurre, el producto presenta una textura "arenosa" desagradable, ya que los cristales se perciben como pequeños granos de arena. Por su parte, cuando se trata de leche condensada azucarada, ésta contiene una alta proporción de sacarosa (de 40 a 45 %) que hace que la lactosa cristalice fácilmente; para evitar esto, previamente se induce la cristalización mediante la adición de lactosa de tamaño muy fino (que pase malla 200) en una cantidad de 250 g por cada 1 000 kg de leche: también se utiliza leche descremada deshidratada como "semilla", pero se requiere doble cantidad. En estas condiciones, la leche produce cristales de tamaño muy pequeño que le confieren una textura muy agradable.

En los helados también se llega a presentar el mismo problema, ya que las bajas temperaturas favorecen la formación de la α -hidratada; para evitar esto, se añade carboximetilcelulosa o algún otro polisacárido como carragenina, que inhiben el proceso de cristalización y no permiten que se produzca la "arenosidad".

Cuando no se permite que este disacárido cristalice, se produce la lactosa amorfa., como ocurre en el secado por aspersion del suero del queso: la eliminación rápida del agua da origen a este tipo de azúcar que es muy higroscópico y tiende a adsorber humedad del aire. Por esta razón, la lactosa se llega a pegar en las paredes del secador, situación que trae consigo inconvenientes en la operación, que repercuten en la calidad final del producto.

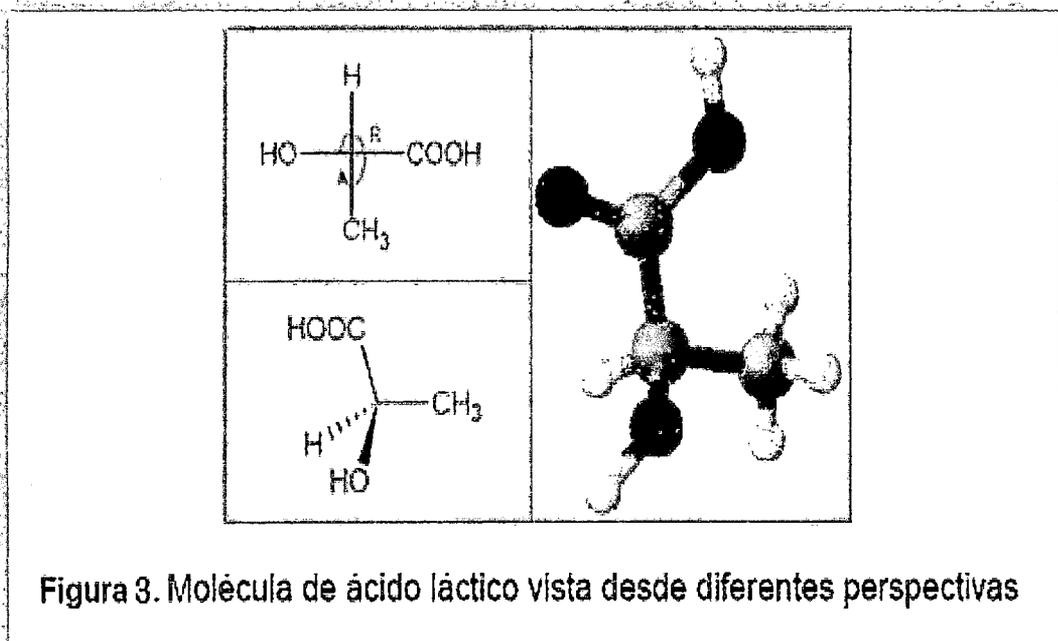
Para evitar esto, es importante inducir primero la cristalización como paso previo a la deshidratación; esto se efectúa en tanques con refrigeración y agitación constantes durante 12 a 18 horas y ayudando la cristalización mediante la adición de cristales del propio disacárido.

Por otra parte, y como ya se indicó en otros capítulos, hay ciertos sectores de la población (sobre todo los de escasos recursos económicos), que no toleran la leche por su contenido de lactosa; esto se debe a que no sintetizan la β -galactosidasa (llamada lactasa) necesaria para la hidrólisis del disacárido en el tracto intestinal. De manera general, se puede considerar que la actividad de esta enzima se incrementa en los primeros meses de vida, para después disminuir considerablemente, de tal forma que muchos adultos carecen prácticamente de ella.

2.3 ACIDO LACTICO

2.3.1 Generalidades

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), fue aislado e identificado por el químico Scheele en 1780 de leche agria, en 1847 fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur, sin embargo no fue hasta 1881 que Littleton inicio la producción por fermentación a escala mundial (Altiok et al., 2006, Serna y Rodríguez, 2005).



El ácido láctico tiene un carbono asimétrico (figura 3) lo cual da lugar a actividad óptica. Existen 2 isómeros ópticos el D(-) ácido láctico y el L(+) ácido láctico, además de una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano (Altiok, 2004). Tanto las dos formas ópticamente activas como la forma racémica se encuentran en estado líquido, siendo incoloros e insolubles en agua. En estado puro son sólidos altamente hidrosféricos de punto de fusión bajo, el cual es difícil de determinar debido a la extrema dificultad de producir el ácido de forma anhidra; es por esta razón que se manejan rango de 18 a 33 °C. El punto de ebullición del producto anhidro está entre 125 y 140°C. Ambas formas isoméricas de ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición.

Las propiedades fisicoquímicas del ácido láctico se encuentran en la tabla 4 (Serna y Rodríguez 2005)

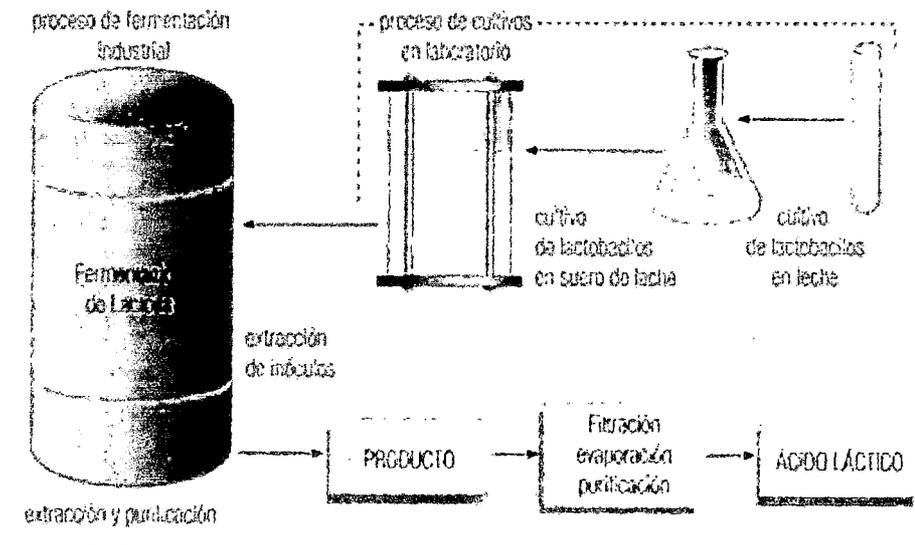
cuadro 4 Propiedades físico-químicas del ácido láctico

Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90.08
Punto de fusión	L(+) y D(-) 52.8 – 54 °C
	DL (Según composición) 16.8 – 33 °C
Punto de ebullición	125 – 140 °C
PKa	3.87 a 25°C

(Serna y Rodríguez, 2005; Ríos 2011).

Producción de ácido láctico

Fermentación láctica: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus lactis*



Fuente: <http://fermentacionlactea.wikispaces.com/>

2.3.2 Aplicaciones

Actualmente la demanda mundial del ácido láctico está en aumento, debido a sus múltiples aplicaciones en el campo alimentario y no alimentario, en especial en la fabricación de biopolímeros (Cui et al., 2012). Esto se debe en gran medida por la propiedad única de tener presente en su estructura un grupo ácido carboxílico y un hidroxilo, lo cual hace posible su participación en una amplia variedad de reacciones químicas como esterificación, condensación, polimerización, reducción y sustitución, y esto contribuye a su gran potencial como plataforma química para una amplia gama de productos con extensas aplicaciones industriales (Altiok 2004; pal et al., 2009).

El ácido láctico se utiliza en muchos alimentos; en su mayoría es empleado para la producción de emulsificantes, aditivos alimentarios, aplicaciones farmacéuticas y de cosméticos. es un ácido orgánico muy importante con un gran mercado debido a sus múltiples

propiedades(Altiok *et al* ,2006). Por ejemplo el ácido láctico y sus sales son preferidos a otros ácidos orgánicos en la industria de alimentos, ya que no domina otros sabores, no es volátil.

Algunos de sus usos es como conservador acidulante y potenciador de sabor en muchos alimentos o bebidas (cerveza, gelatina, queso, entre otros) (Jhon *et al* ,2007). Por otra parte la posibilidad de la conversión directa de ácido láctico a ácido acrílico, lo ha convertido en una importante materia prima para la industria química (Alonso *et al.*, 2010).

Recientemente la producción de plásticos biodegradables a partir de ácido láctico ha acelerado la investigación sobre su producción como materia prima a granel (Altiok *et al* ,2006). Algunos ejemplos de productos derivados del ácido láctico que han tenido una gran demanda en los últimos años son: termoplásticos y biodegradables (ejemplo ácido poliláctico), solventes verdes (ejemplo etil, propil, butil), y químicos oxigenados(glicol de propileno)(Pal *et al.*,2009; Young-Jung y Ryu 2009).

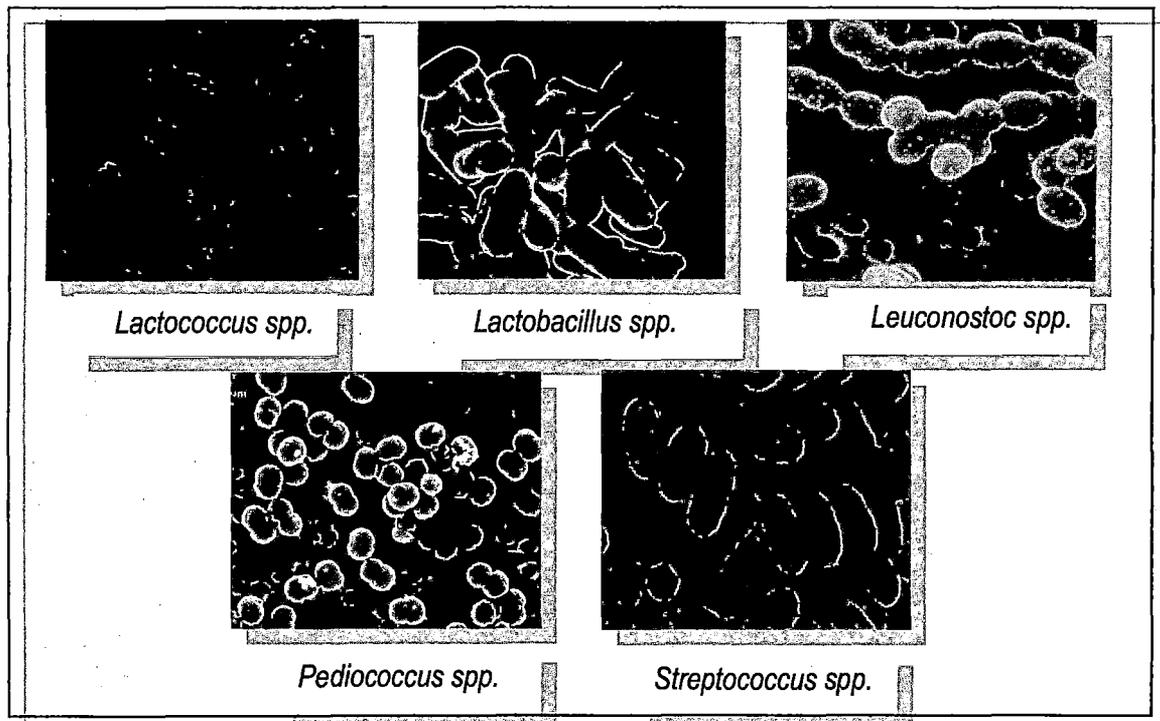
2.4 BACTERIA ACIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias lácticas son gram positivas, ácido tolerantes, algunos en rangos de pH entre 4.8 y 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos[1] Son organismos que no forman esporas, son inmóviles, cocos o bacilos con bajo contenido de guanina y citocina, y asociados todos por sus características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas son bacterias que generalmente se encuentran en plantas y productos lácteos en descomposición produciendo ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. Esta particularidad ha enlazado, históricamente, a los BAL con la producción de alimentos fermentados, pues la acidificación que producen inhibe el crecimiento de agentes que causan descomposición. Más aún, algunas BAL son productoras

de bacterocinas tóxicas, proveyendo un obstáculo adicional para los microorganismos patogénicos. De hecho, el ácido láctico y otros productos metabólicos de las BAL contribuyen a las propiedades organolépticas y el perfil textural de un alimento específico. La importancia industrial de las BAL se evidencia también porque, por lo general consideradas no peligrosas, debido a que están en variados alimentos y por su contribución como flora saprófita de las superficies mucosas humanas. Los géneros básicos que comprenden las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus* así como los Lactobacillales *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella*.

2.4.1 Características Generales de las Bacterias del Ácido Láctico (BAL)

Son microorganismos con una limitada capacidad biosintética, por lo tanto requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos. Como carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones, reciben energía por fosforilación a nivel sustrato. Producen energía únicamente por fermentación. Carecen de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo, razón por la cual son catalasa -.Crecen en presencia o ausencia de O₂. Comúnmente no son móviles Forman colonias pequeñas nunca pigmentadas. Poseen gran tolerancia a la acidez. Viven en ambientes asociados a plantas, tracto intestinal (principalmente), fosas nasofaríngeas y vagina.



2.4.2 LACTOBACILLUS BULGARICUS

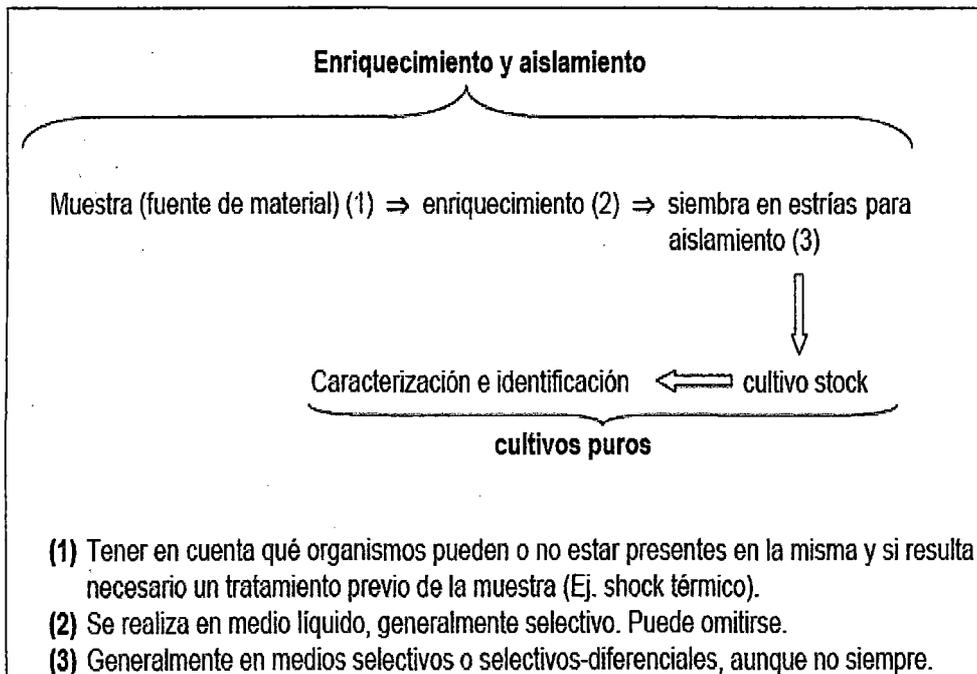
Lactobacilos búlgaros, nombre común con el que se conoce a las colonias de las bacterias *Lactobacillus bulgaricus*, las cuales son conglomerados de bacterias lácticas y levaduras de asociación simbiótica estable embebidas en una matriz de polisacáridos, cuyo tamaño varía de entre 5mm y 2.5 mm; de consistencia elástica y de color blanco-amarillento (Ulloa- Lappe, 1993). A pesar de que fueron descubiertas por el búlgaro Dr. Stamen Grigorov en 1905 (1878 -1945), siendo aún estudiante de medicina, las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, las responsables de la fermentación de la leche, ya eran conocidas por los antiguos tracios que vivían en el territorio de la Bulgaria moderna desde 6000 -7000 a. C. Las utilizaron para inducir la fermentación de la leche de oveja para obtener yogur, queso, etc., y que serían los primeros alimentos probióticos en el mundo.

Los lactobacilos búlgaros presentan tres formas estructurales diferentes: laminar, enrollada y convoluta; los microorganismos que las constituyen presentan una disposición de estratos definida. La forma laminar presenta dos superficies, una lisa, colonizada por lactobacilos cortos y una rugosa, en la que predominan las levaduras; entre ambas

se encuentra una porción intermedia, donde existe una sustitución de bacilos cortos por levaduras. La forma de convoluta presenta tres capas: la externa, con predominancia de lactobacilos cortos, la media con lactobacilos largos rectos, lactobacilos largos curvos y algunas levaduras y la interna con lactobacilos excrementus y abundantes levaduras embebidos en una matriz cavernosa (Aguilar, 1997).

Se utiliza en la tecnología tradicional de la fermentación de la leche empleando estas bacterias como cultivo iniciador, que puede recuperarse por filtración y usarse infinitamente, siempre y cuando se observen algunas medidas mínimas de higiene. Estos productos han sido importantes en la historia del hombre, las fermentaciones han sido utilizadas por siglos en muchos países y su origen se pierde en los albores del tiempo. Se cree que aparecieron como resultado del crecimiento espontáneo de microorganismos bajo condiciones adecuadas para efectuar la fermentación y así evitar la descomposición.

2.4.3 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO



2.5 FERMENTACIÓN LÁCTICA

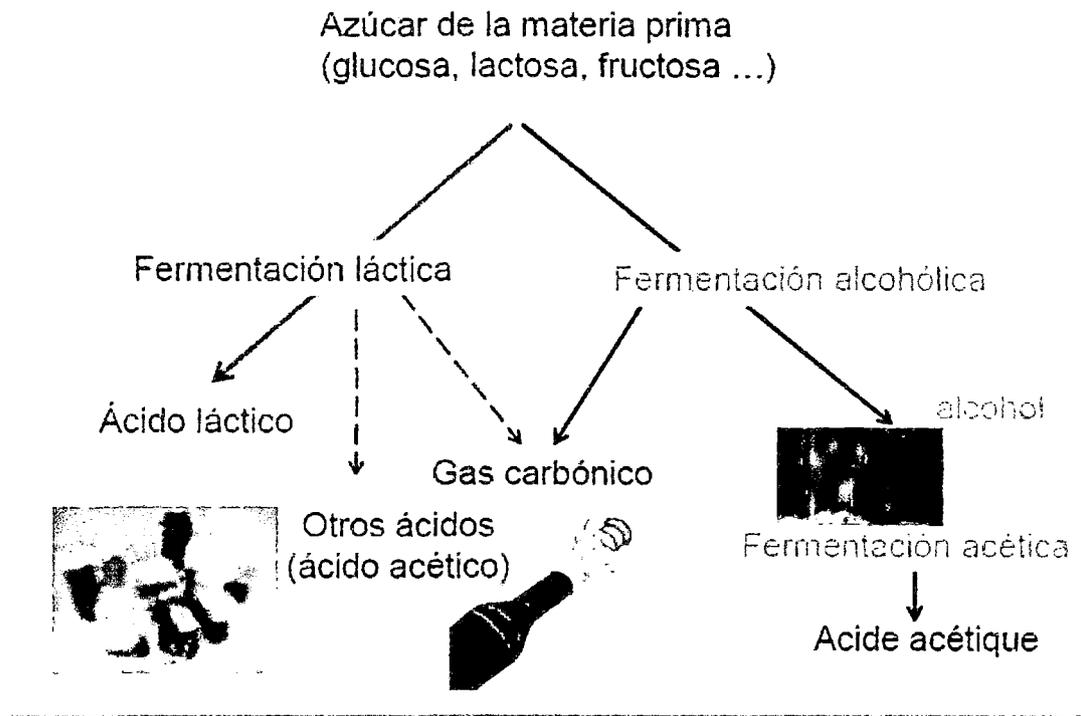
Fermentación láctica se llama al proceso celular donde se utiliza un disacárido para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico.

La fermentación ácido láctica es aquella que se lleva a cabo por las bacterias ácido láctica cuya actividad se desarrolla en ausencia de oxígeno (anaerobiosis), y se manifiesta en la transformación de los azúcares presentes en el vegetal, en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono.

Este proceso lo realizan muchas bacterias (llamadas bacterias lácticas), algunos protozoos y ocurre en los tejidos animales, en ciertos protozoarios, hongos y bacterias. Un ejemplo de este tipo de fermentación es la acidificación de la leche. Ciertas bacterias (lactobacilos), al desarrollarse en la leche, utilizan la lactosa (azúcar de leche) como fuente de energía. La lactosa, al fermentar, produce energía que es aprovechada por las bacterias y el ácido láctico es eliminado. La coagulación de la leche (cuajada) resulta de la precipitación de las proteínas de la leche, y ocurre por el descenso de pH debido a la presencia de ácido láctico. En ausencia de oxígeno, las células animales convierten el ácido pirúvico en ácido láctico. El ácido láctico puede ser un veneno celular. Cuando se acumula en las células musculares produce síntomas asociados con la fatiga muscular. El ácido láctico tiene excelentes propiedades conservantes de los alimentos.

El ácido láctico se produce mediante la Fermentación alcohólica y fermentación láctica. En condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobias), la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glicolisis. En la glicolisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y pasan a la forma NADH. Para que puedan tener lugar las reacciones de la glicolisis que producen energía es necesario restablecer el NAD^+ por otra reacción. Los dos tipos de fermentación

que se ilustran aquí son particularmente importantes ya que, sus subproductos –ácido láctico en el primer caso y etanol en el segundo-, son utilizados en la industria alimentaria.



fuelle: <http://fermentacionlactea.wikispaces.com/>

CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización y duración

Institución: Laboratorios de Orgánica, Físicoquímica y analítica de la Escuela Profesional de Ingeniería Química y Laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas, pertenecientes a la Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo"- Lambayeque.

La fase de experimental tuvo una duración entre los meses de junio y septiembre de 2014.

3.2 Población y muestra de estudio

3.2.1 Población

Suero de leche extraída de la industria quesera de Lambayeque.

3.2.2 Muestra

3 litros lactosuero para 5 muestras de 100 ml cada una de la cual se aislara lactosa. Luego para el proceso de producción de ácido láctico se utilizó 5 gramos de lactosa previamente hidrolizada y suplementada con extracto de levadura y triptona que será incubada con el microorganismo ya seleccionado (*Lactobacillus bulgaricus*), para la posterior fermentación.

3.3 Materiales

3.3.1 Materiales.

- Vasos de precipitación
- Pizeta
- Pipetas
- Cintas de pH (caja de cintas pH)
- Probetas de 100 ml
- Pinzas
- Frasco de vidrio ámbar
- tubos de ensayo
- campanas de Duncan
- asas bacteriológicas
- papel filtro

- placas petri

3.3.2 Equipos y reactivos.

- Balanza Analítica
- Cocina eléctrica
- Termómetro a 100 °C
- Agua destilada
- estufa
- Agar APT
- 3 lts Suero de leche
- 125 ml yogurt natural
- 5 litros de alcohol etílico 96°
- Acido acético
- Reactivo de benedict
- Reactivo de felhing
- Carbonato de calcio
- Azul de metileno
- Hidróxido de sodio

3.3.3 Técnicas de recolección de datos de observación.

- ✓ Memoria USB 4 GB
- ✓ Cuaderno de apuntes
- ✓ Libro de recolección de datos

3.4. Metodología Experimental

a) Recepción de materia prima

La materia prima fue proporcionada por la industria quesera de Lambayeque, quienes nos proporcionaron 3 litros de suero, de lo cual se tomaron pequeñas muestras de 100 ml que en la etapa de concentración se redujo a concentraciones finales de 10, 15, 20, 30% y una sin concentrar en volumen esto es: 10 ml, 15ml, 20 ml, 30 ml y 100ml respectivamente.

b) Aislamiento de la Lactosa

Este método abarca la precipitación y desnaturalización de las proteínas por varios métodos, así como la cristalización de lactosa presente en la solución, para luego aislarla, caracterizarla y cuantificarla.

- Se colocan los 3 litros de suero de leche, en un recipiente esterilizado y se calienta hasta llegar a una temperatura de 40° C. No se debe exceder esa temperatura.

- Se agrega de inmediato 60 gr de carbonato de calcio finamente dividido al recipiente que contiene el suero, se agita por 10 minutos y luego se lleva a ebullición.

- Se debe mantener el calentamiento por 10 minutos, agitando ocasionalmente para evitar proyecciones (el carbonato tiende a acumularse en el fondo del vaso de precipitado). Mientras tanto, se puede preparar el equipo para filtración.

Se filtra la solución, varias veces si es necesario (pero cambiando el papel filtro cada vez), hasta obtener un filtrado claro. Se debe mantener caliente la solución durante la filtración (no es necesario que hierva). El precipitado se descarta.

Este filtrado es repartido en 25 muestra de 100 ml cada para los 5 ensayo posteriores, esto es 5 muestras por cada ensayo.

- Se concentra el filtrado hasta reducirlo a un volumen entre el rango según el experimento (10-30% en volumen y una sin concentrar). Se deben evitar proyecciones agitando continuamente.

- Cuando la solución llegue a 80° C (medir la temperatura), añade etanol de 96° GL (la cantidad es de acuerdo al volumen final de suero, ejemplo para vol final de 10ml suero = 60 ml etanol). Se agrega una pizca de carbón activado.

- Se guarda el frasco con tapadera. Se debe tapar bien el frasco y guardarlo en el refrigerador.

- Una semana después, se filtra la solución, usando un papel filtro previamente tarado. Los cristales de lactosa aparecerán a los lados y al fondo del recipiente, como agregados esféricos, que se deben raspar para ser desprendidos.

- Posteriormente se pesan los cristales obtenidos. Respecto a la densidad medida del suero, se calcula el porcentaje en peso de la lactosa obtenida.

c) Caracterización de la Lactosa

La caracterización de la lactosa abarca medida de los puntos de fusión y la prueba de azúcares reductores que consiste en la oxidación del azúcar por medio de los reactivos de Benedict y Fehling.

➤ Azúcares Reductores

- En primer lugar se preparan las soluciones de Fehling y de Benedict.

- **La solución de Fehling** se prepara mezclando dos soluciones por partes iguales inmediatamente antes de usarlas. A continuación se presenta la preparación de estas dos soluciones.

Solución de sulfato de cobre: Disolver 34.639 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua, y diluir a 500 ml.

Solución alcalina de tartrato: Disolver 173 g de sal de Rochele (tartrato de sodio y potasio) y 50 g de hidróxido de sodio en agua; diluir a 500 ml y dejar reposar durante dos días, luego de lo cual se filtra para eliminar cualquier precipitado presente.

- **La solución de Benedict** se prepara con 17.3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 173 g de citrato sódico o potásico y 100 g de carbonato sódico anhidro, todo disuelto en agua y diluido hasta hacer un litro.

- Se prepara una solución de lactosa disuelta en agua.

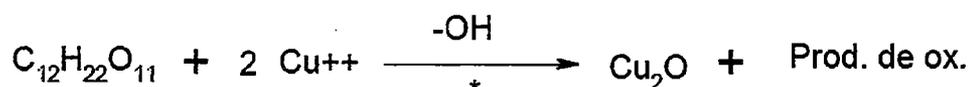
- En un tubo de ensayo se mezcla aproximadamente 2 ml de la solución de lactosa, con 2 ml de la solución de Fehling o Benedict, según el caso.

- El tubo de ensayo se calienta en baño maría hasta que empieza a hervir, se mantiene a ebullición por 2 min y luego, sin retirar la flama, se añaden

unas gotas de la solución de azul de metileno, y se deja hervir por 3 min sin interrupción.

- La completa decoloración del azul de metileno indica que hay azúcar reductor en exceso, mostrando la reducción del cobre, el cual precipita como óxido cuproso, de color rojo o naranja brillante.
- La prueba es positiva si aparece el precipitado de óxido cuproso, probando así el carácter reductor del azúcar utilizado.

Reacción de oxidación de la lactosa y reducción del cobre.



* Benedict= citrato, Fehling = tartrato

Fuente: Gustavo Solá Villatoro 2006

d) Obtención del microorganismo de fermentación *Lactobacillus Bugaricus*, extraído del yogurt y sembrados en agar rogosa

La cepa se obtendrá aislando el *Lactobacillus bulgaricus* del yogurt sembrado en un medio (agar APT) en placas petri previamente esterilizado, por un tiempo de 72 h, incubado a una temperatura de 34°C

Una vez adaptado el microorganismo se procede a cuantificarlo en el medio de transporte, mediante a) siembra en superficie, b) peso seco. con lo cual se podrá calcular la población microbiana por mililitro, sabiendo que se evaluará concentraciones de inóculo

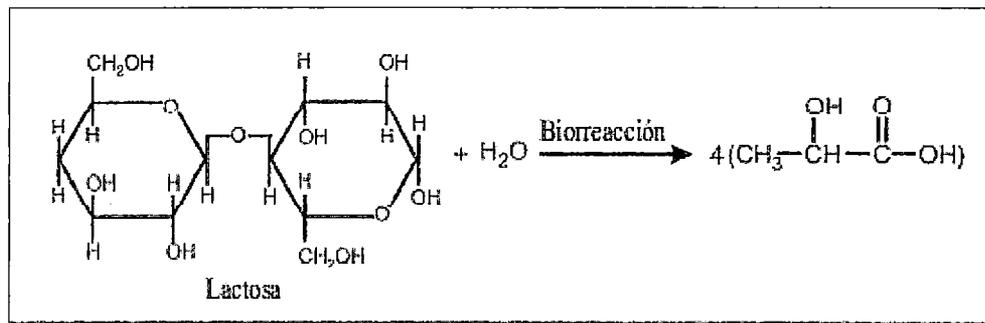
e) Suplemento de lactosa cristalizada:

Se suplementó con 12 g/l de extracto de levadura y 7.5 g/l de peptona tripsica de caseína. Todos los químicos utilizados como suplemento fueron de grado analítico.

f) Fermentación de lactosa suplementada

La lactosa suplementada es almacenada en un recipiente hermético para fermentación, previamente esterilizado. Luego procedemos a calentarlo en la estufa a 34° C por 20 min, preparándolo así para la fermentación.

Pasada este tiempo añadimos el cultivo en proporción de 10% v/v, homogenizamos y lo colocamos en la estufa a 34°C, verificando el porcentaje de acidez mediante la titulación con hidróxido de sodio 0.1N, cada 12 h hasta que este sea constante.



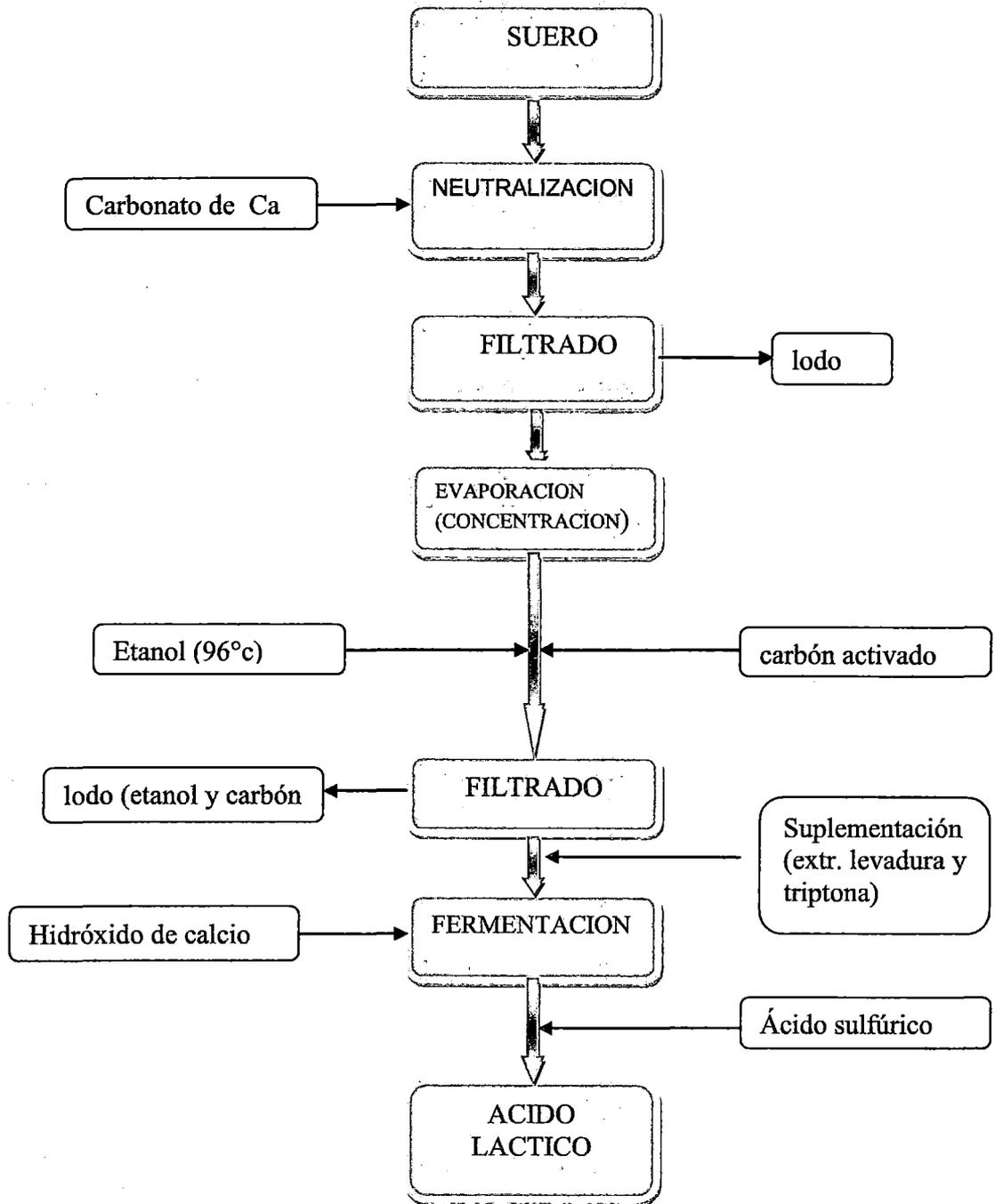
Fuente: Ricardo Heliodoro Gil-Horán 2008

g) Procedimiento para la separación del ácido láctico a partir del caldo fermentado

El trabajo de separación del ácido láctico a partir del caldo fermentado, en esta variante, se realizara combinando el método tradicional y estudiando alternativas que posibilitaran la disminución de costos y altas purzas en el producto final.

El procedimiento consiste en aumentar el pH con hidróxido de cal para la formación de la sal láctica junto al calentamiento del caldo para incrementar la solubilidad de la sal. Posteriormente se lleva a cabo la acidificación con ácido sulfúrico para la formación del ácido, filtración y decoloración.

Figura N° 17
DIAGRAMA DE FLUJO



Fuente: Los autores

3.5. Variables de estudio

- ✓ La variable independiente es la cantidad de lactosuero empleado en las muestras.
- ✓ La variable dependiente es el rendimiento de Lactosa obtenida del lactosuero
- ✓ La variable dependiente es la cantidad de ácido láctico obtenido en el proceso de fermentación.

3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza, para determinar si entre los niveles hay diferencias significativas.

La primera hipótesis nula será que hay igualdad de medias entre los niveles, así:

Para los volúmenes finales de suero de leche después de concentrarlos

Ho: 10%=15%=20%=30%=sin concentrar

Ha: Al menos dos son diferentes.

La segunda hipótesis nula será que hay igualdad de medias entre los niveles, así:

Para las cantidades finales de ácido láctico producido por el método de fermentación con las 5 muestra.

Ho: Muestra1=Muestra2=Muestra3=Muestra4=Muestra5

Ha: al menos dos son diferentes.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

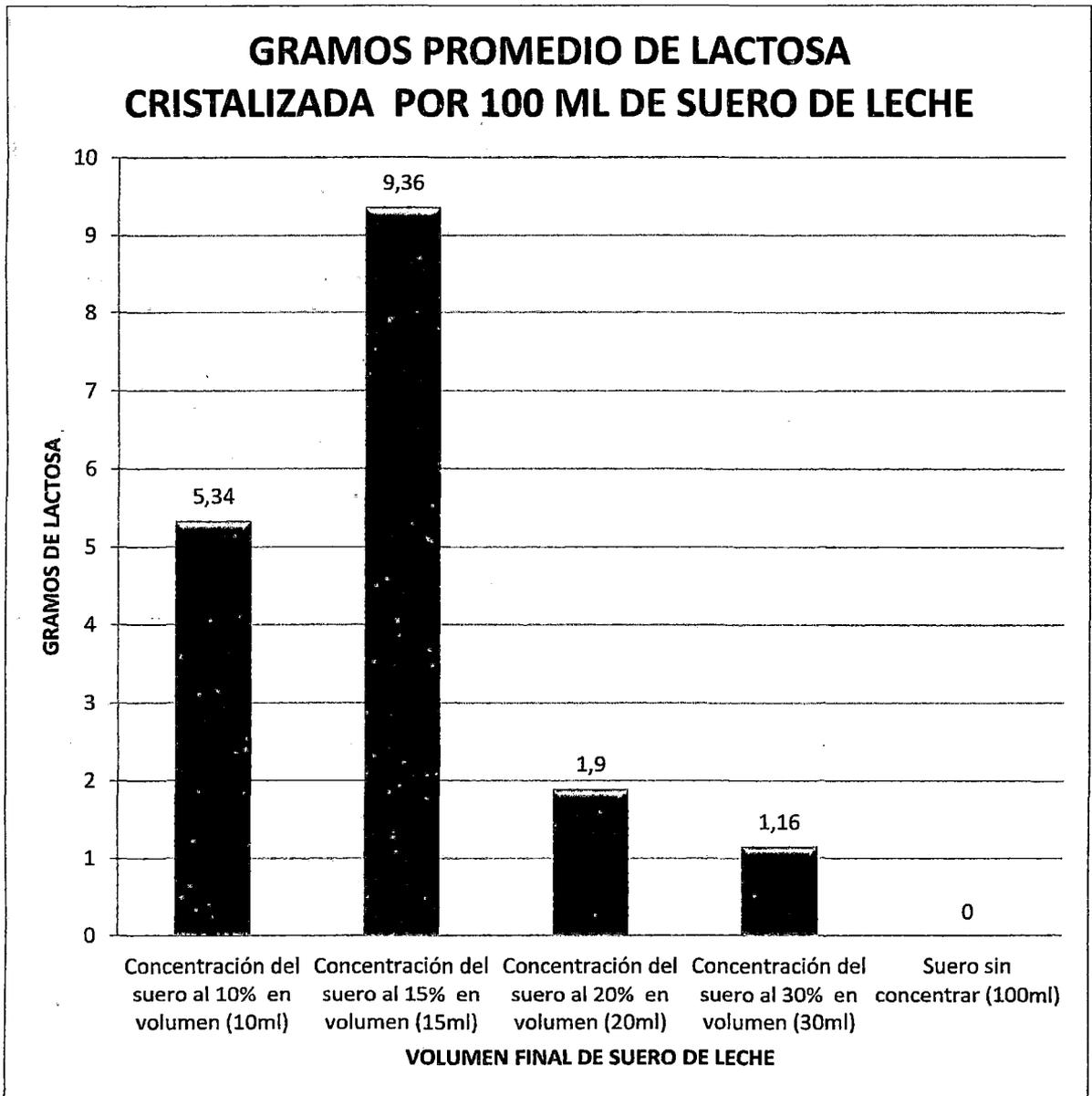
4.1 PRODUCCION DE LACTOSA CRISTALIZADA POR CADA MUESTRA DE 100 ML DE SUERO DE LECHE CON DIFERENTES CONCENTRACIONES

Aplicando la estadística al utilizar las variaciones de volúmenes finales de suero de leche, por muestras de 100 ml de suero de leche, se obtuvo lo siguiente:

- Con una concentración final de suero de leche al 10% que es un volumen final de 10 ml, se obtuvo un promedio de 5.34gr de lactosa cristalizada; un mínimo y un máximo de 4.9 y 5.6 gr de lactosa respectivamente.
- Con una concentración final de suero de leche al 15% que es un volumen final de 15 ml, se obtuvo un promedio de 9.36 gr de lactosa cristalizada; un mínimo y un máximo de 8.9 y 9.6 gr de lactosa respectivamente.
- Con una concentración final de suero de leche al 20% que es un volumen final de 20 ml, se obtuvo un promedio de 1.9 gr de lactosa cristalizada; un mínimo y un máximo de 1.7 y 2.1 gr de lactosa respectivamente.
- Con una concentración final de suero de leche al 30% que es un volumen final de 30ml, se obtuvo un promedio de 1.16 gr de lactosa cristalizada; un mínimo y un máximo de 1 y 1.5 gr de lactosa respectivamente.
- Suero sin concentrar que es un volumen final de 100 ml, no cristalizó solo se mantuvo como una masa vulnerable a solubilizarse con el alcohol

Gráfico N° 01

- Gráfico de barras de Promedios de gramos de lactosa según concentraciones finales a partir de 100 ml de suero de leche



Fuente: los autores

4.2 CANTIDAD Y DESVIACION ESTANDAR DE LACTOSA POR CADA LITRO DE SUERO DE LECHE

Aplicando la estadística al utilizar las variaciones de volúmenes finales de suero de leche, por cada litro de leche de leche, se obtuvo lo siguiente:

- Con una concentración final de suero de leche al 10% que es un volumen final de 100 ml, se obtuvo un promedio de 53.4 gr de lactosa cristalizada; una desviación estándar de 2.966; un mínimo y un máximo de 49 y 56 gr de lactosa respectivamente.
- Con una concentración final de suero de leche al 15% que es un volumen final de 150 ml, se obtuvo un promedio de 93.6 gr de lactosa cristalizada; una desviación estándar de 2.793; un mínimo y un máximo de 89 y 96 gr de lactosa respectivamente.
- Con una concentración final de suero de leche al 20% que es un volumen final de 200 ml, se obtuvo un promedio de 19 gr de lactosa cristalizada; una desviación estándar de 1.581; un mínimo y un máximo de 17 y 21 gr de lactosa respectivamente.
- Con una concentración final de suero de leche al 30% que es un volumen final de 300 ml, se obtuvo un promedio de 11.6 gr de lactosa cristalizada; una desviación estándar de 2.302; un mínimo y un máximo de 10 y 15 gr de lactosa respectivamente.
- Suero sin concentrar que es un volumen final de 1000 ml, no se obtuvo lactosa cristalizada

Tabla N° 01

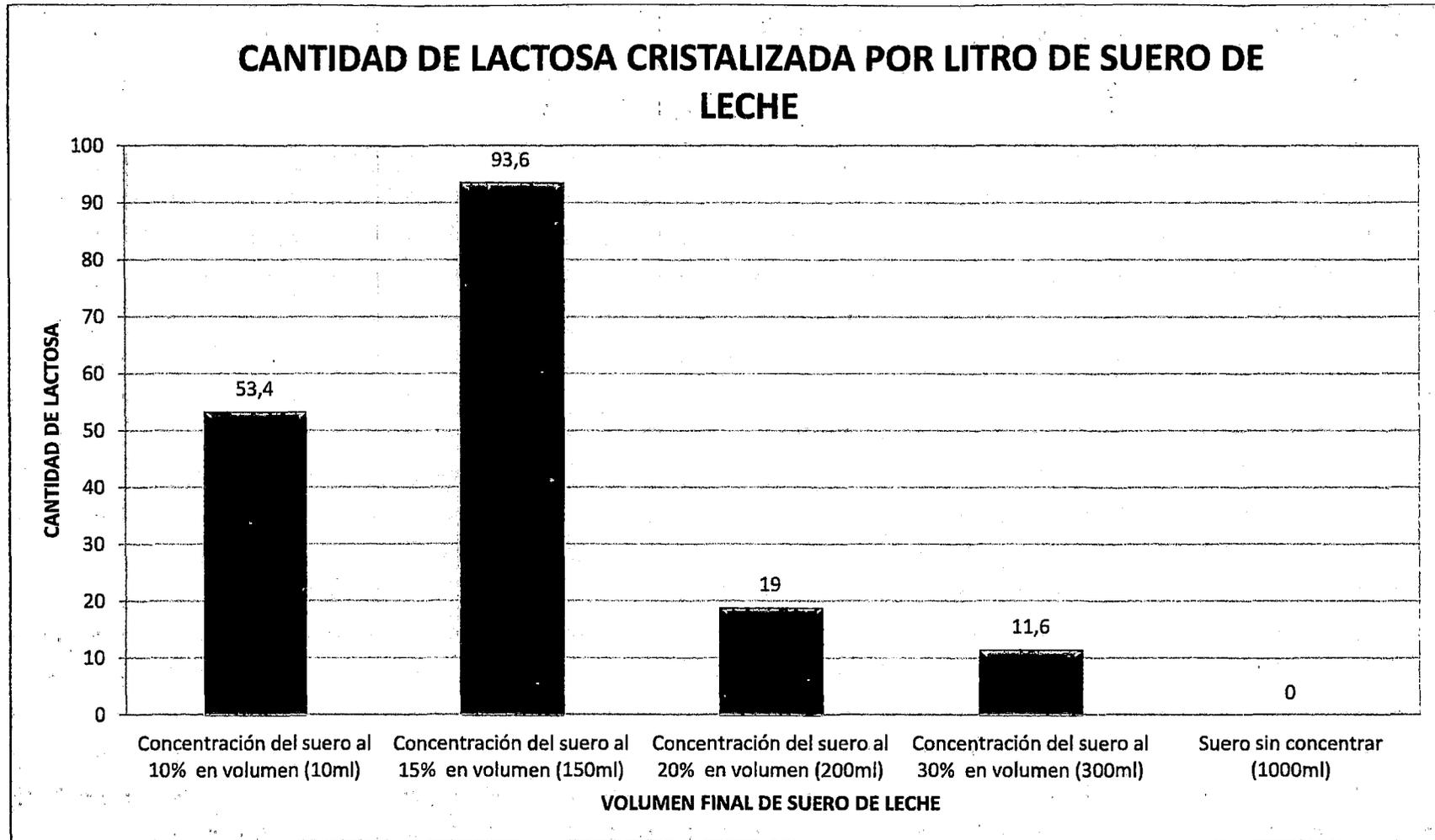
Medidas de rendimiento de lactosa cristalizada según el volumen final de suero de leche.

ESTADISTICOS	100ml	150ml	200ml	300ml	1000ml
PROMEDIO	53.4	93.6	19	11.6	0
VARIANZA	8.8	7.8	2.5	5.3	0
DESV. ESTANDAR	2.966	2.793	1.581	2.302	0
MINIMO	49	89	17	10	0
MAXIMO	56	96	21	15	0
NI	5	5	5	5	5
t _J	267	468	95	58	0

Fuente: Autores

Gráfico N° 02

Gráfico de barras de Promedios del rendimiento de lactosa según concentraciones finales de suero de leche a partir de un litro



Fuente: Los autores

Interpretación: En el gráfico N° 02 se puede observar las barras que describen los rendimientos de lactosa según las concentraciones finales de suero de leche, observándose que el mayor rendimiento de lactosa se obtuvo al 15% de concentración del suero, esto es 150 ml de 1 litro de suero, siendo esta de 93.6 gr de lactosa/Litro de suero de leche, también se puede observar que en las demás concentraciones se obtienen cantidades menores de rendimiento de lactosa

4.3 ANALISIS DE VARIANZA DE LA LACTOSA

Para determinar si hay una diferencia significativa entre los rendimientos de lactosa a volúmenes finales de suero de leche en el proceso de concentración del mismo, se utilizó el análisis de varianza cuyos resultados se encuentran en la tabla N° 02. Para lo cual se planteó las hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu$: los promedios son iguales

$H_0: \mu_1 \neq \mu$: los promedios son diferentes.

TABLA N° 02

Análisis de Varianza para determinar la productividad de lactosa según los volúmenes finales

ANOVA de un factor					
Rendimiento Fermentativo					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
TRATAMIENTO	28998.64	4	7249.66	1399.548	2.87
ERROR	103.6	20	5.18		
TOTAL	29102.24	24	7254.84		

Fuente: Los autores

Conclusión: Con un nivel de significancia del 5% se concluye que existen diferencias significativas entre los diferentes volúmenes finales de suero de leche.

Interpretación: En la tabla N° 02 se observa el análisis de varianza, en la cual el valor del estadístico F calculado es igual a 1399.548 y la probabilidad de cometer el error de tipo I es de ($P < 0,05$), indicador que nos permite rechazar la hipótesis nula, por lo tanto nos aseguraría que existe diferencia significativa entre los promedios de los volúmenes finales de suero de leche.

4.3 PRODUCCION DE ACIDO LACTICO

Aplicando la estadística al utilizar diferentes tiempos de fermentación, se obtuvo lo siguiente:

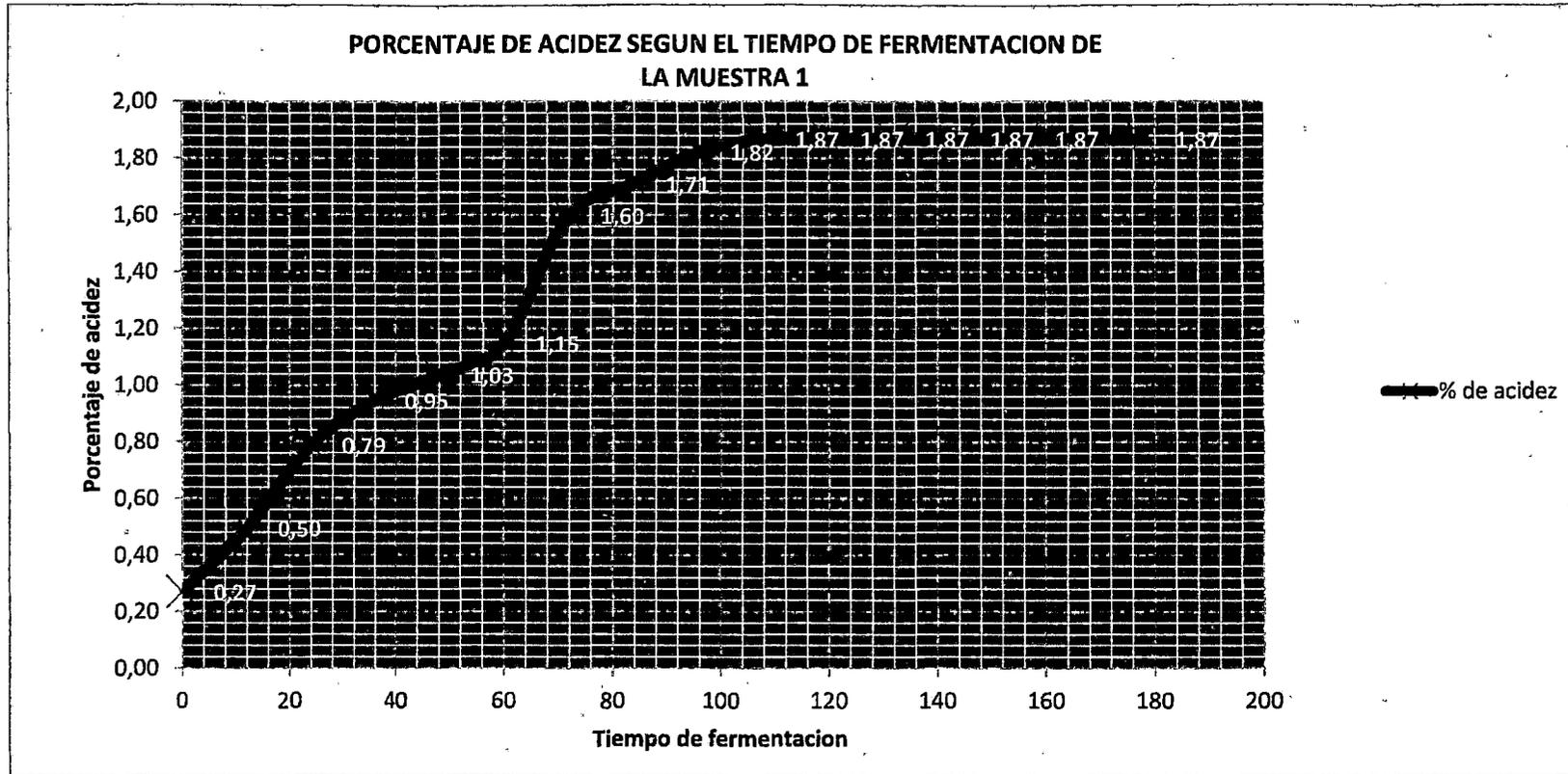
- Muestra 1: lactosa de suero concentrado a 10%**
- Muestra 2: lactosa de suero concentrado a 15%**
- Muestra 3: lactosa de suero concentrado a 20%**
- Muestra 4: lactosa de suero concentrado a 30%**
- Muestra 5: lactosa de suero sin concentrar**

Previamente se hidrolizo y suplemento a la Lactosa de cada muestra para luego ser fermentada con la cepa de *Lactobacillus Bulgaricus*.

- La muestra 1, con un tiempo de fermentación de 108 h, utilizando 8.3 ml de hidróxido de sodio en la titulación, se obtuvo un porcentaje de acidez constante de 1.87%, esto es 1.87g/100ml.
- La muestra 2, con un tiempo de fermentación de 108 h, utilizando 9.5 ml de hidróxido de sodio en la titulación, se obtuvo un porcentaje de acidez constante de 2.14%, esto es 2.14 g/100ml.
- La muestra 3, con un tiempo de fermentación de 132 h, utilizando 6.9 ml de hidróxido de sodio en la titulación, se obtuvo un porcentaje de acidez constante de 1.55%, esto es 1.55g/100ml.
- La muestra 4, con un tiempo de fermentación de 132h, utilizando 6.7 ml de hidróxido de sodio en la titulación, se obtuvo un porcentaje de acidez constante de 1.51%, esto es 1.51 g/100ml.
- La muestra 5, con un tiempo de fermentación de 144 h, utilizando 3.5 ml de hidróxido de sodio en la titulación, se obtuvo un porcentaje de acidez constante de 0.79%, esto es 0.79 g/100ml.

Gráfico N° 03

Gráfico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la MUESTRA 1

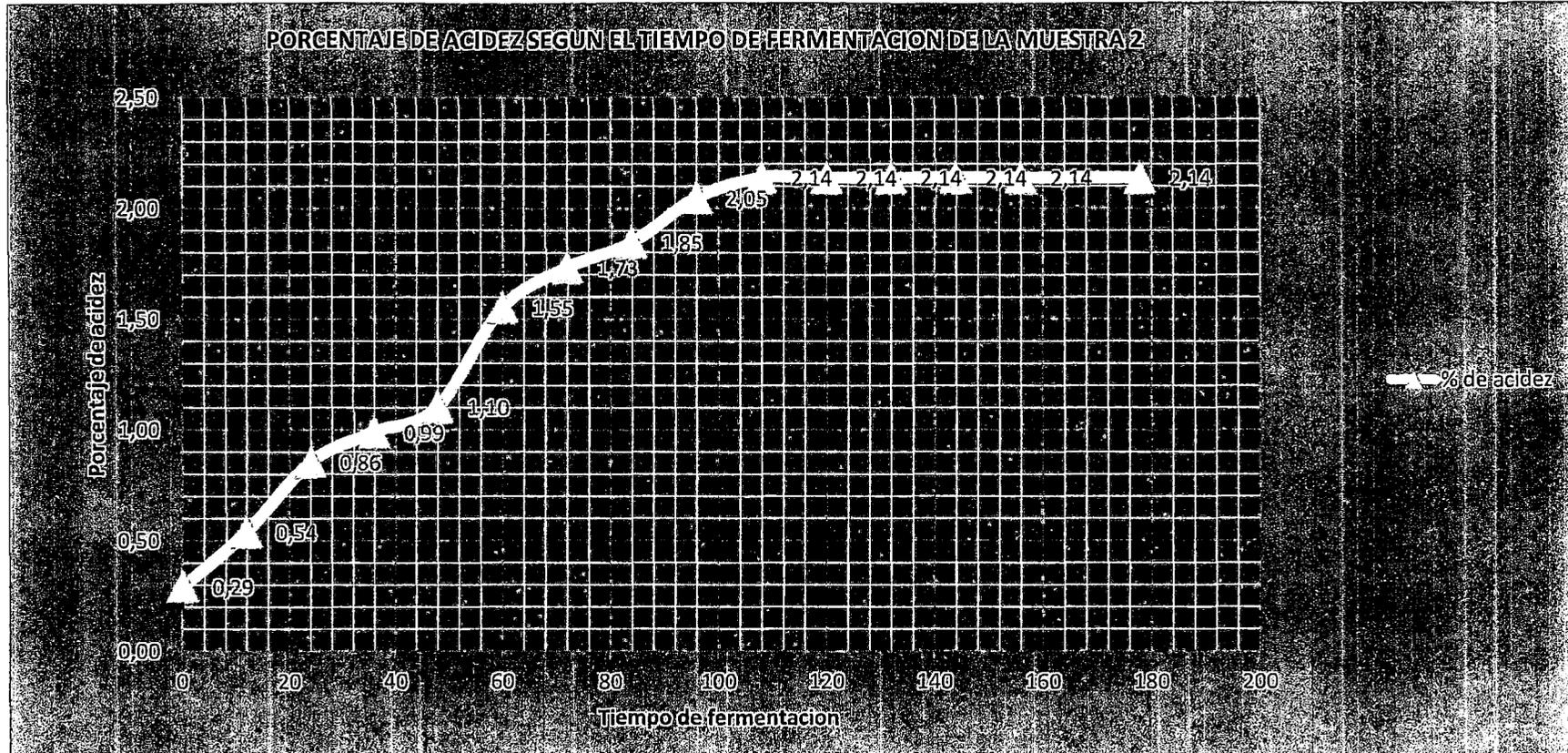


Fuente: los autores

Interpretación 1: En el gráfico N° 03 se puede observar la curva que describe la producción de ácido láctico según los tiempos de fermentación de la Muestra 1, observándose que a las 108 horas, esto es 5 días, el porcentaje de acidez es constante (1.87%), lo cual nos indica el máximo tiempo de fermentación.

Gráfico N° 04

Gráfico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la MUESTRA 2

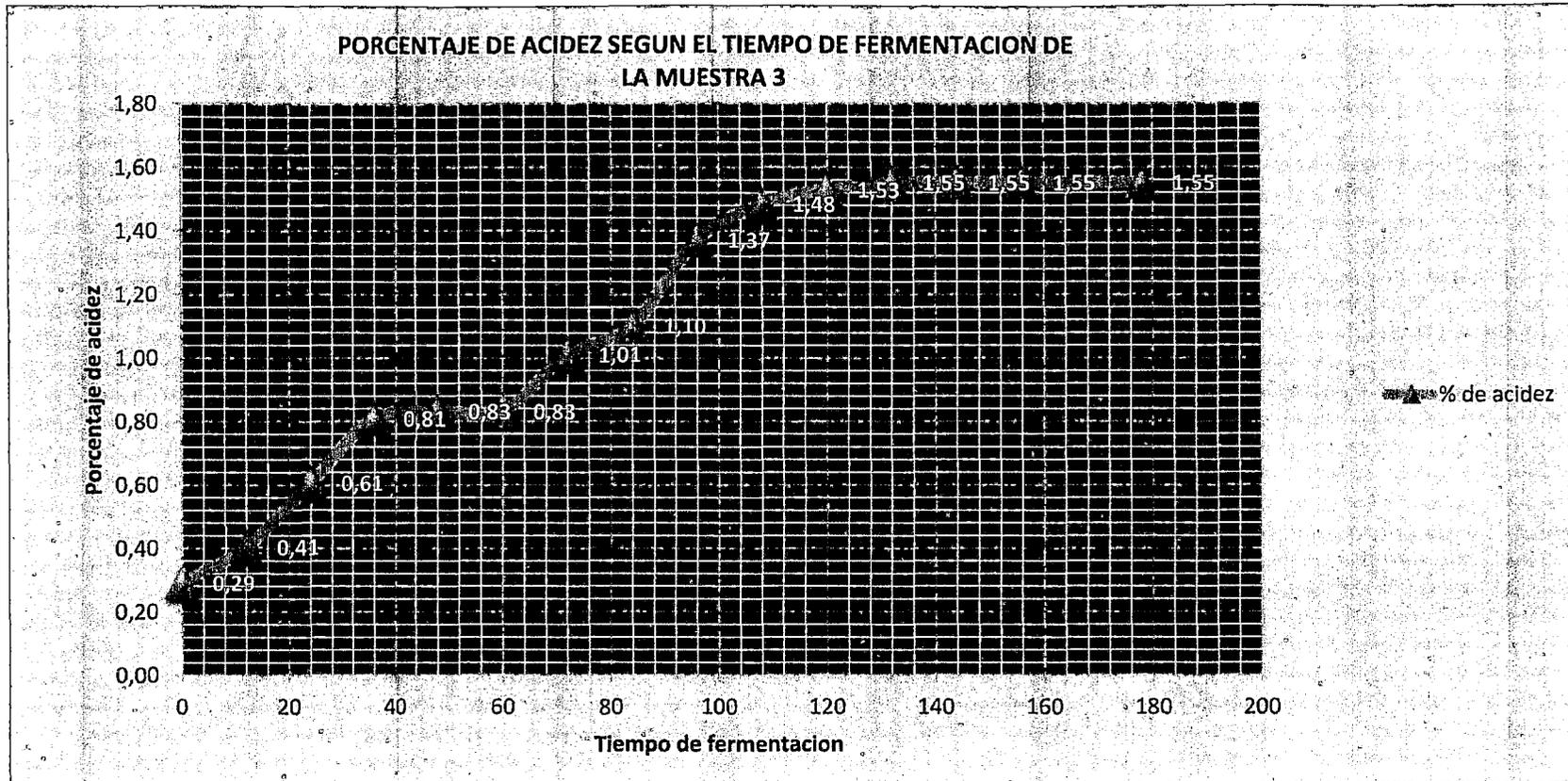


Fuente: los autores

Interpretación 2: En el gráfico N° 04 se puede observar la curva que describe la producción de ácido láctico según los tiempos de fermentación de la Muestra 2, observándose que a las 108 horas, esto es 5 días, el porcentaje de acidez es constante (2.14%), lo cual nos indica el máximo tiempo de fermentación.

Gráfico N° 05

Gráfico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la MUESTRA 3

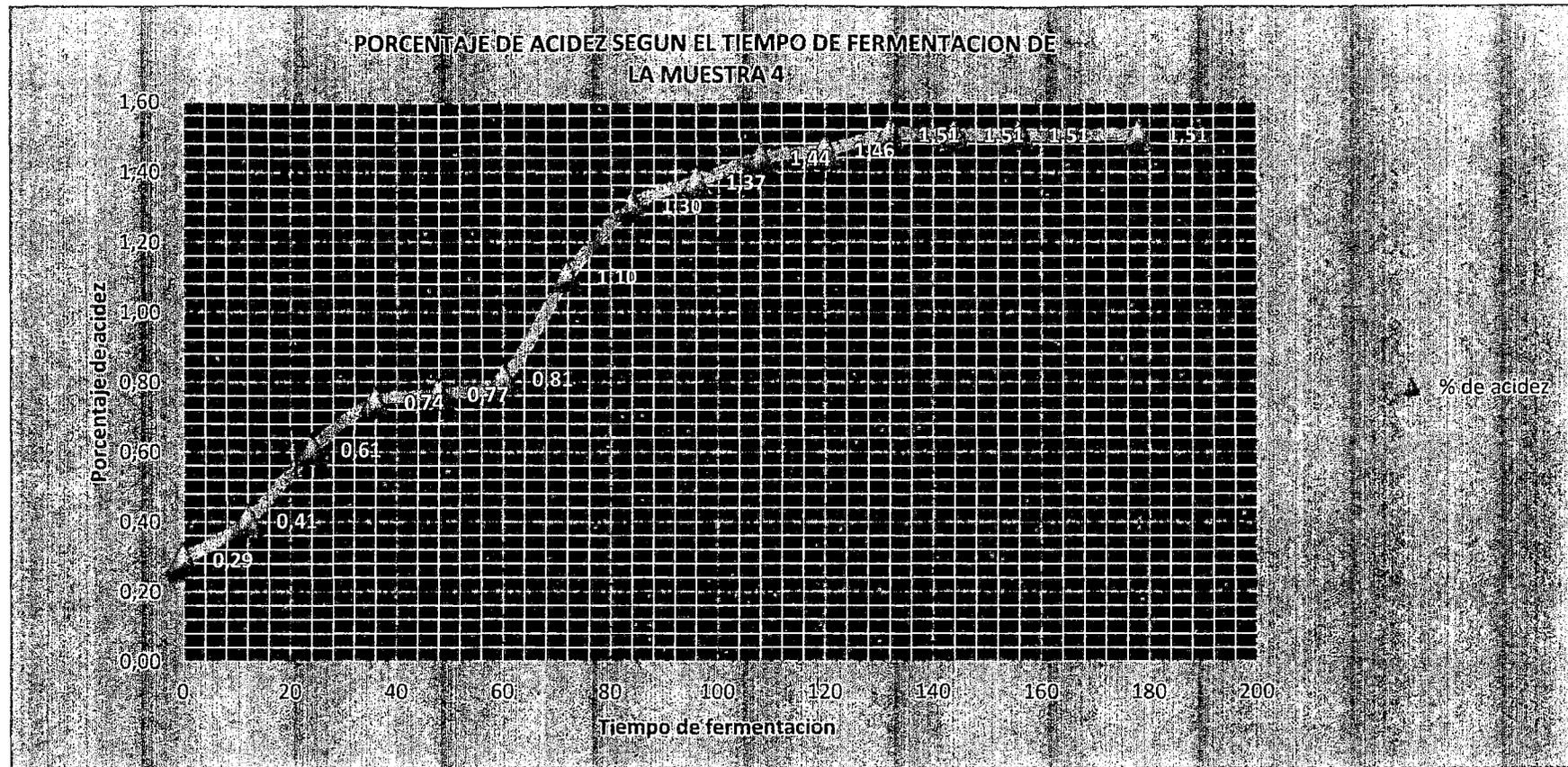


Fuente: Los autores

Interpretación 3: En el gráfico N° 05 se puede observar la curva que describe la producción de ácido láctico según los tiempos de fermentación de la Muestra 3, observándose que a las 120 horas, esto es 5 días y medio, el porcentaje de acidez es constante (1.55%), lo cual nos indica el máximo tiempo de fermentación.

Gráfico N° 06

Gráfico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la MUESTRA 4

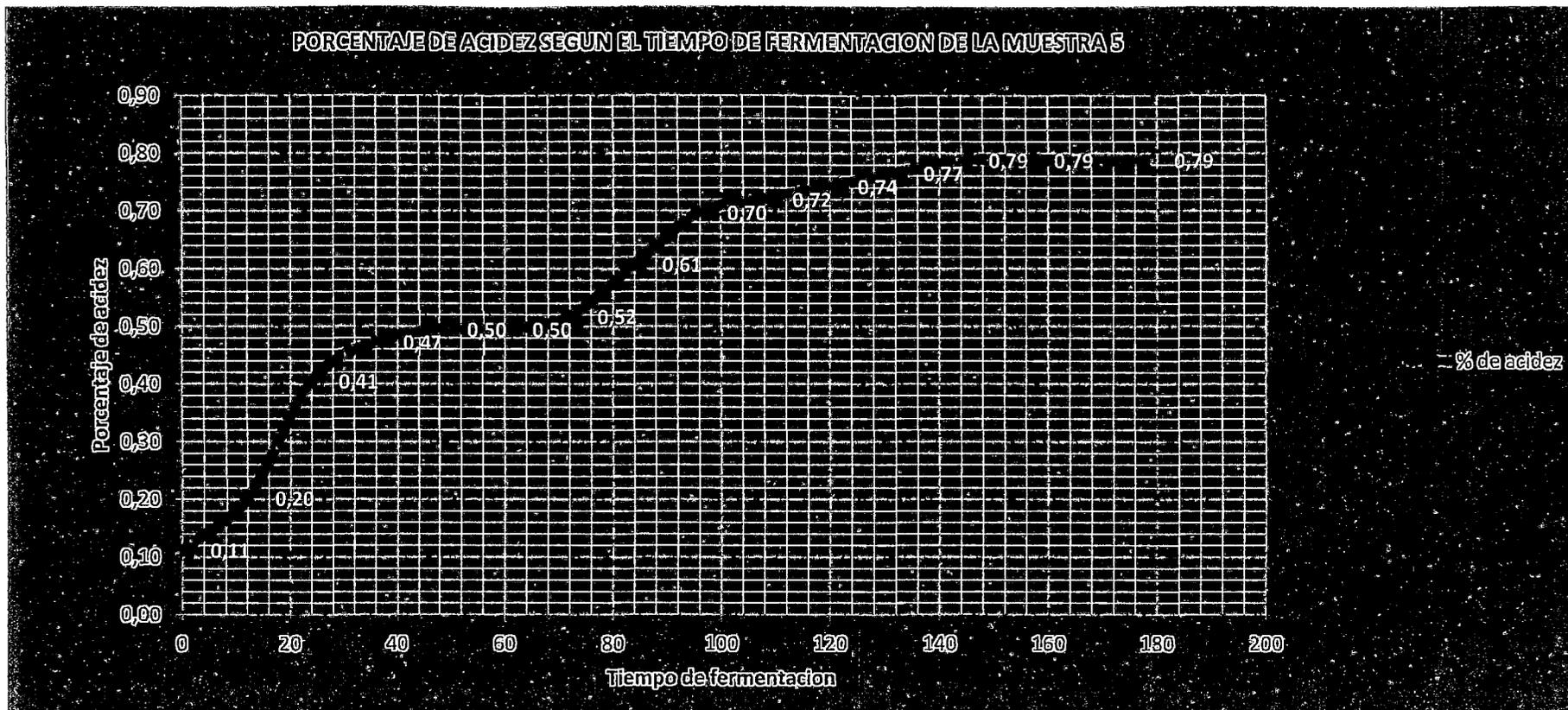


Fuente: los autores

Interpretación 4: En el gráfico N° 06 se puede observar la curva que describe la producción de ácido láctico según los tiempos de fermentación de la Muestra 4, observándose que a las 120 horas, esto es 5 días y medio, el porcentaje de acidez es constante (1.51%), lo cual nos indica el máximo tiempo de fermentación.

Gráfico N° 07

Gráfico de los porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de la MUESTRA 5

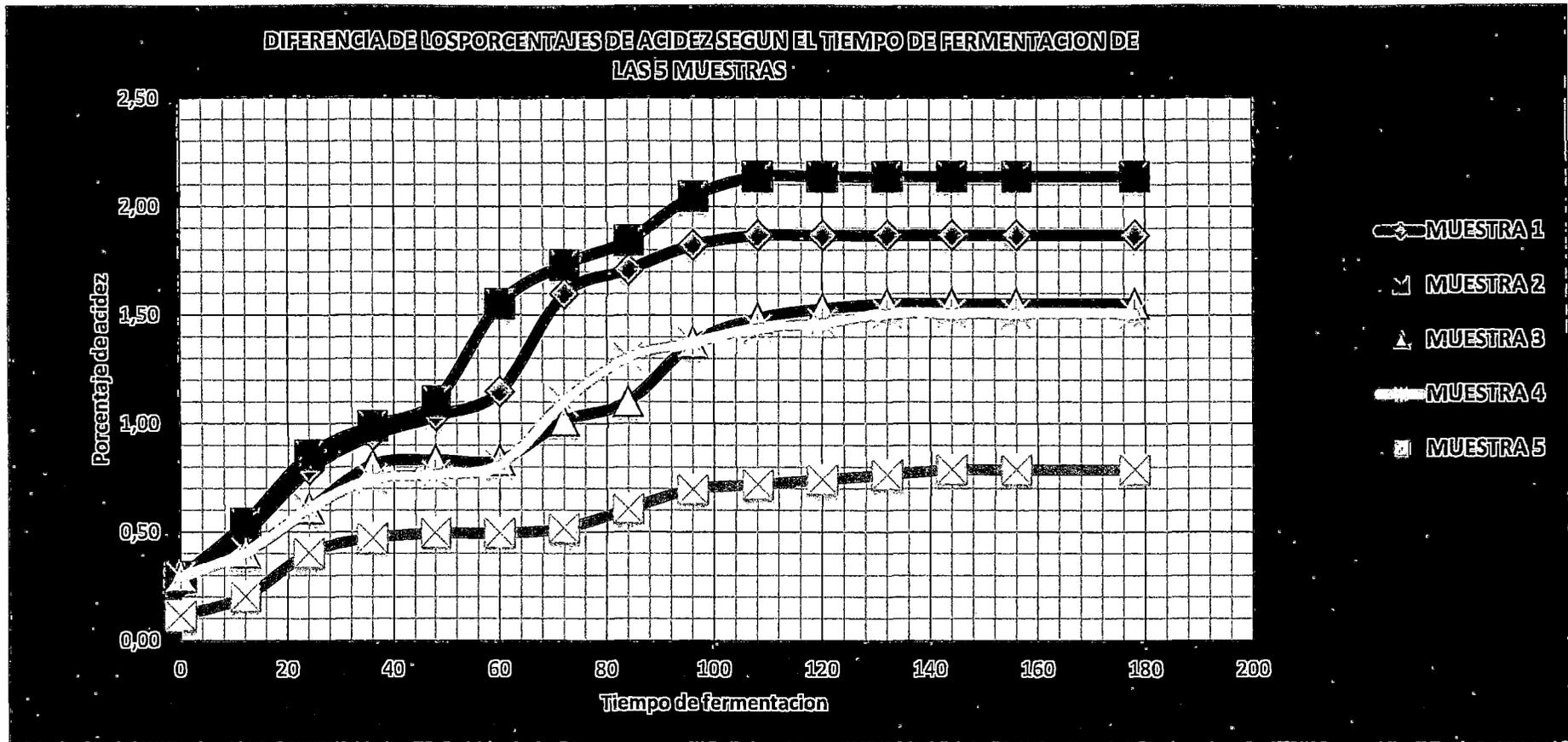


Fuente: los autores

Interpretación 5: En el gráfico N° 07 se puede observar la curva que describe la producción de ácido láctico según los tiempos de fermentación de la Muestra 5, observándose que a las 144 horas, esto es 6 días y medio, el porcentaje de acidez es constante (0.79%), lo cual nos indica el máximo tiempo de fermentación.

Gráfico N° 08

Gráfico de diferencias de porcentajes o producción de ácido según el tiempo de fermentación de las 5 MUESTRAS



Fuente: los autores

Interpretación final: En el gráfico N° 08 se puede observar las curvas que describen la producción de ácido láctico según los tiempos de fermentación de las 5 Muestras, observándose que en la muestra 2 hay mayor producción de ácido, cerciorándonos que es la mejor muestra para producir ácido láctico.

4.4 ANALISIS DE VARIANZA DEL ACIDO LACTICO

Para determinar si hay una diferencia significativa entre los porcentajes de acidez final de las fermentaciones de cada una de las 5 muestras, se utilizó el análisis de varianza cuyos resultados se encuentran en la tabla N° 02. Para lo cual se planteó las hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu$: los promedios son iguales

$H_0: \mu_1 \neq \mu$: los promedios son diferentes.

TABLA N° 02

Análisis de Varianza para determinar la productividad de ácido láctico según las fermentaciones de cada muestra

ANOVA de un factor					
Rendimiento Fermentativo					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
TRATAMIENTO	6.4039	4	1.6009	3156.34	2.76
ERROR	0.01268	25	0.0005072		
TOTAL	6.41658	29	1.60140		

Fuente: Los autores

Conclusión: Con un nivel de significancia del 5% se concluye que existen diferencias significativas entre la producción de ácido láctico en cada caldo de fermentación que contiene cada una de las 5 muestras

Interpretación: En la tabla N° 02 se observa el análisis de varianza, en la cual el valor del estadístico F calculado es igual a 3156.34 y la probabilidad de cometer el error de tipo I es de ($P < 0,05$), indicador que nos permite rechazar la hipótesis nula, por lo tanto nos aseguraría que existe diferencia significativa entre los rendimientos de ácido láctico en cada caldo de fermentación de cada una de las 5 muestras.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se ha realizado el presente trabajo de investigación, teniendo en cuenta sus ventajas y limitaciones, se concluye:

- Que podemos sintetizar ácido láctico a partir de lactosuero desproteínizado utilizando *Lactobacillus Bulgaricus* obteniendo grandes resultados a comparación con los métodos convencionales.
- Para concentrar el suero de leche previo a la etapa de cristalización es necesario reducirlo hasta un volumen del 15% del total para lograr mayor rendimiento de lactosa.
- En el proceso de fermentación de la lactosa con el *Lactobacillus Bulgaricus* se realizó a una T° de 34°C y con un tiempo de fermentación de 108 h y se obtuvo un porcentaje de acidez de 2.14%.
- Se logró obtener un promedio de 93.6 gramos de lactosa cristalizada y 44.07ml de ácido láctico por cada litro de suero extraído de las industrias queseras de Lambayeque

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

- En el proceso de cristalización de lactosa es necesario agregar solo una pizca de carbón activado, ya que al excedernos, se alteraría las características del producto final.
- Los materiales deben estar completamente esterilizados ya que es un proceso muy vulnerable a microorganismos patógenos y requiere de grandes cuidados medioambientales.
- La bacteria *Lactobacillus bulgaricus* y el medio de crecimiento (ATP) se sugiere mantener a temperatura ambiente o bajo condiciones de refrigeración y sellada herméticamente.
- La temperatura de fermentación con esta bacteria es necesario mantenerlo en el rango establecido que es 32 a 36°C, ya que si excediera o disminuyera, el microorganismo muere o estaría inactivo respectivamente.

CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFIA

- Araya C. 2010 Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (ananas comosus), para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico. Revista Iberoamericana de Polímeros. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. ed. al. Araya-cloutier 2010.
- Arellano A. 2013 "Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membranas. Tesis para obtener el Título de Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Queretaro-México.
- Bertrán L. 2012, Producción de ácido láctico a partir de residuos de la industria quesera. Grupo de investigación Biotransformación Colombia.
- Dautant, 1985. "Estudio sobre la producción de ácido láctico a partir de un proceso de fermentación de melaza". Tesis para optar el grado Académico de Maestría en Ingeniería Química, Ed. Monterrey N. L.
- Moure Fernández¹, F.; Rendueles de la Vega²P, M., Planta de producción de ácido láctico alimentario. Desarrollo de la ingeniería del proceso y del proyecto industrial. Área de Proyectos de Ingeniería. Departamento de Explotación y Prospección de Minas. Universidad de Oviedo.
- Jakymec M. 2001 Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. Revista Científica FCV-LUZ Vol. XI. Universidad de Zulia -Maracaibo Venezuela.
- Heliodoro R. 2008 Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cascara de naranja: procesos de separación y purificación. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal vol. 23, núm. 2, julio-diciembre, 2008, pp. 79-90, Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos – México

- López D. 2007 Estudio y síntesis en la producción de ácido poliláctico (PLA). Tesis para obtener el grado de Maestro en Tecnología Avanzada. Centro de investigación aplicada del Instituto Politécnico nacional de Altamira.
- Núñez A. 2009. Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. ISSN (Versión impresa) 0138-6204.
- Ríos A. 2011 Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas. Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República de la facultad de Química de la universidad Autónoma de Querétaro- México.
- Sánchez J. 2005. "Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos". Tesis para optar el grado de Doctor. Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. Asturias
- Sánchez N. 2007 "Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato". Revista de la facultad de química farmacéutica Universidad de Antioquia Medellín-Colombia vol. 14 págs. 27-34.
- Sola G. 2006 Estudio de factibilidad para la producción de ácido láctico comercial, a nivel industrial en Guatemala.
- Suarez D. 2007 Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 7469.
- Urribarri L. 2004, Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. Revista Científica Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela. vol. 14.

2. REFERENCIAS LINKOGRÁFICAS:

- Lactosa:
<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/25/4/cap1.pdf>

- Biotecnología alimentaria:
Editado por Mariano García Garibay, Rodolfo Quintero Ramírez, Agustín López-Munguía Canales.
Lactosa .Pág. 154
http://books.google.com.pe/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA160&lpg=PA160&dq=solubilidad+y+cristalizacion+de+la+lactosa.&source=bl&ots=_qx29dxCyk&sig=FbbY2eXhhxOemiwhlkFX4qFucVQ&hl=es&sa=X&ei=-v8YVNiXDIjEggTTv4GIAw&ved=0CEIQ6AEwBw#v=onepage&q=solubilidad%20y%20cristalizacion%20de%20la%20lactosa.&f=false

- Ciencia de la leche: principios de técnica lechera
Escrito por Charles Alais .editorial REVERTE
Cristalización de la lactosa pág. 34
Solubilidad de la lactosa. Pág. 37
http://books.google.com.pe/books?id=bW_ULacGBZMC&pg=PA37&lpg=PA37&dq=solubilidad+de+la+lactosa.&source=bl&ots=QMTnb03-ix&sig=3nWmuqxUKBTY7mvfWLNxt3C6P-8&hl=es&sa=X&ei=OAMZVKudKlJoggSwtlCQDg&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q=solubilidad%20de%20la%20lactosa.&f=false

- Propiedades físicas de la lactosa
www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r18960.DOC

- Producción de ácido láctico y lactatos
http://www.biolaster.com/productos/analisis_lactato/utilidad_acido_lactico

- Revista: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 11 No. 1 (136 - 143) Enero-Junio 2013
CARLOS GARCÍA M.1; GUILLERMO ARRÁZOLA P.2.; MARCELA VILLALBA C.3
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LACTICO DE LACTOSUERO SUPLEMENTADO UTILIZANDO *Lactobacillus casei*.

<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n1/v11n1a17.pdf>

- Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia.

Versión impresa ISSN 0254-0770

Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia v.30 n.1 Maracaibo abr. 2007

Ana Machado, Leopoldo Gorrochotegui y Antonio Cárdenas

Lactic acid separation from fermented whey using electrodialysis

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0254-7702007000100007&script=sci_arttext

- Fermentación Láctica

<http://fermentacionlactea.wikispaces.com/>

- Revista Peruana de Biología

Rev. Perú Biol. Vol. 14. N° 2 Lima dic. 2007

Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo

Waldir Estela^{1,3}, Mojmír Rychtera¹, Karel Melzoch¹, Elena Quillama² y Erida Egoavil²

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-9332007000300014

- L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies

Process Biochemistry. Volumen 41, Número 6, junio de 2006, páginas 1451 a 1454

Shaofeng Ding, Tianwei Tan

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511306000201>

- The production of L(+) and D(-) lactic acid in cultures of some lactic acid bacteria, with a special study of *Lactobacillus acidophilus* NCDO 2

<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5126860>

Journal of Dairy Research Volumen 34 / Número 01 / febrero de 1967, pp 31-38

Ellen I. Garvie

CAPITULO VIII: APENDICE

APENDICE 1: Cálculos Estadísticos

PRODUCCION DE LACTOSA

- **Primer ensayo**

TABLA N° 01
Datos del Primer ensayo

MUESTRA	Suero de leche(ml)	Concentración del suero al 10% en volumen (ml)	Gramos de lactosa
1	100	10	4.9
1	100	10	5.6
1	100	10	5.4
1	100	10	5.2
1	100	10	5.6

Fuente: Los autores.

- **Segundo ensayo**

TABLA N° 02
Datos del Segundo ensayo

MUESTRA	Suero de leche(ml)	Concentración del suero al 15% en volumen (ml)	Gramos de lactosa
2	100	15	9.5
2	100	15	8.9
2	100	15	9.6
2	100	15	9.3
2	100	15	9.5

Fuente: Los autores.

- Tercer ensayo

TABLA N° 03
Datos del Tercer ensayo

MUESTRA	Suero de leche(ml)	Concentración del suero al 20% en volumen (ml)	Gramos de lactosa
3	100	20	2.1
3	100	20	1.7
3	100	20	1.9
3	100	20	2.1
3	100	20	1.7

Fuente: Los autores.

- cuarto ensayo

TABLA N° 04
Datos del Cuarto ensayo

MUESTRA	Suero de leche(ml)	Concentración del suero al 30% en volumen (ml)	Gramos de lactosa
4	100	30	1.5
4	100	30	1.0
4	100	30	1.3
4	100	30	1.0
4	100	30	1.0

Fuente: Los autores.

- Quinto ensayo

TABLA N° 05
Datos del Quinto ensayo

MUESTRA	Suero de leche(ml)	Suero sin concentrar	Gramos de lactosa
5	100	100	-
5	100	100	-
5	100	100	-
5	100	100	-
5	100	100	-

Fuente: Los autores.

**CUADRO N°1
EVALUACION ORGANOLEPTICA**

	TEXTURA	COLOR	ASPECTOS GENERALES	OBSERVACIONES
Muestra 1	amorfa	blanco amarillento	Cristales de escasa dimensión	Parte del suero se desnaturalizo durante la concentración
Muestra 2	Cristales definidos	blanco	Cristales de mediana dimensión	El proceso de concentración se realizó correctamente si alterar la naturaleza del suero
Muestra 3	Cristales definidos	Blanco	Cristales de mediana dimensión	El proceso de concentración se realizó correctamente si alterar la naturaleza del suero
Muestra 4	Cristales definidos	Blanco	Cristales de gran dimensión	El proceso de concentración se realizó correctamente si alterar la naturaleza del suero
Muestra 5	Masa amorfa	Gris	No cristalizó	Solo precipito una masa gris en el fondo del recipiente

Fuente: los autores

ANALISIS ESTADISTICOS

CUADRO N° 02

Rendimiento de Lactosa por cada muestra

	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Tercer Ensayo	Cuarto Ensayo	Quinto Ensayo
	Concentración del suero al 10% volumen final: (10ml)	Concentración del suero al 15% volumen final: (15ml)	Concentración del suero al 20% volumen final: (20ml)	Concentración del suero al 30% volumen final: (30ml)	Suero sin concentrar volumen final: (100ml)
Muestras	gr lactosa /100ml suero de leche	gr lactosa /100ml suero de leche			
1	4.9	9.5	2.1	1.5	-
2	5.6	8.9	1.7	1.0	-
3	5.4	9.6	1.9	1.3	-
4	5.2	9.3	2.1	1.0	-
5	5.6	9.5	1.7	1.0	-
PROMEDIO	5.34	9.36	1.9	1.16	-
PORCENTAJE	5.34	9.36	1.9	1.16	-

Fuente: Los autores.

CUADRO N° 03

Rendimiento de Lactosa por litro de suero de leche

	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Tercer Ensayo	Cuarto Ensayo	Quinto Ensayo
	Concentración del suero al 10% volumen final: (100ml)	Concentración del suero al 15% volumen final: (150ml)	Concentración del suero al 20% volumen final: (200ml)	Concentración del suero al 30% volumen final: (300ml)	Suero sin concentrar volumen final: (1000ml)
Muestras	Rend.gr lactosa/L suero de leche	Rend.gr lactosa/L suero de leche			
1	49	95	21	15	-
2	56	89	17	10	-
3	54	96	19	13	-
4	52	93	21	10	-
5	56	95	17	10	-
PROMEDIO	53.4	93.6	19	11.6	-

Fuente: Los autores.

- Cálculo de desviación estándar

Concentración del suero al 10% vol. final 100ml:

$$\text{Desviación st} = \overline{8.8} = 2.966$$

Concentración del suero al 15% vol. final 150ml:

$$\text{Desviación st} = \overline{7.8} = 2.793$$

Concentración del suero al 20% vol. final 200ml:

$$\text{Desviación st} = \overline{2.5} = 1.581$$

Concentración del suero al 30% vol. final 300ml:

$$\text{Desviación st} = \overline{5.3} = 2.302$$

Suero sin concentrar vol. final 1000ml:

$$\text{Desviación st} = \overline{0} = 0$$

CUADRO N° 04

Máximo y mínimo rendimiento de lactosa por cada concentración final de suero de leche

VOL. FINAL	100ml	150ml	200ml	300ml	1000ml
MINIMO	49	89	17	10	0
MAXIMO	56	96	21	15	0
Ni	5	5	5	5	5

Fuente: Los autores.

- ni total:

$$N = 5 + 5 + 5 + 5 + 5 + 5 = 25$$

- K=5
- n:5
- T_j: 888

vol. final 100ml

$$Suma = 49 + 56 + 54 + 52 + 56 = 267$$

vol. final 150ml

$$Suma = 95 + 89 + 96 + 93 + 95 = 468$$

vol. final 200ml

$$Suma = 21 + 17 + 19 + 21 + 17 = 95$$

vol. final 300ml

$$Suma = 15 + 10 + 13 + 10 + 10 = 58$$

vol. final 1000ml

$$Suma = 0 + 0 + 0 + 0 + 0 = 0$$

Suma Total:

$$T_j = 267 + 468 + 95 + 58 + 0 = 888$$

ANAVA POR DCA

Usando una variable de significancia de $\alpha=0,05$

- $H_p: u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5$

H_a : Al menos un u es diferente de los demás. $i=1, 2, 3, 4, 5$

- Suma total de cuadrados:

$$\begin{aligned} SC &= 49^2 + 56^2 + 54^2 + 52^2 + 56^2 + 95^2 + 89^2 + 96^2 + 93^2 + 95^2 + 21^2 + 17^2 \\ &\quad + 19^2 + 21^2 + 17^2 + 15^2 + 10^2 + 13^2 + 10^2 + 10^2 + 0^2 + 0^2 + 12.8^2 \\ &\quad + 0^2 + 0^2 = 60644 \end{aligned}$$

$$SCT = 60644 - \frac{888^2}{25} = 29102.24$$

- Suma de cuadrados dentro de los grupos, TRATAMIENTOS:

$$SC = 267^2 + 468^2 + 95^2 + 58^2 + 0^2 = 302702$$

$$SCt = \frac{302702}{5} - \frac{888^2}{25} = 28998.64$$

- Suma de cuadrados entre los grupos, error:

$$SCE = 29102.24 - 28998.64 = 103.6$$

- Grados de Libertad:

De tratamiento: $5-1=4$

De error: $25-5=20$

Total: $20+4=24$

- Cuadrados medios:

De tratamiento:

$$CMt = \frac{28998.64}{5-1} = 7249.66$$

De error:

$$CME = \frac{103.6}{25-5} = 5.18$$

- Cálculo de Fc o Rv:

$$Fc = \frac{7249.66}{5.18} = 1399.548$$

- Cálculo de Ft:

Por tabla encontramos

$$F(0,95;4;20)=2,87$$

- Criterio Decisivo:

Se acepta H_p si $F_c < F_t$

Se rechaza H_p si $F_c > F_t$

$F_t=2.87$

Esto nos dice que podemos rechazar la H_p porque:

$$1399.548 > 2,87$$

Por lo tanto podemos afirmar que existe Significancia en al menos un valor de la concentración de lactosa en los volúmenes finales de suero de leche

APENDICE 2: Cálculos Estadísticos

PRODUCCION DE ACIDO LACTICO

Medio de fermentación: lactosa hidrolizada y suplementada con extracto de levadura y Triptona

Bacteria: *Lactobacillus bulgaricus*

T° de fermentación= 34°C

P= 1 atm

Muestra 1: lactosa de suero concentrado a 10%

Muestra 2: lactosa de suero concentrado a 15%

Muestra 3: lactosa de suero concentrado a 20%

Muestra 4: lactosa de suero concentrado a 30%

Muestra 5: lactosa de suero sin concentrar

$$\% \text{ de acidez} = \frac{\text{ml de NaOH gastados} \times 0.009 \times 100}{\text{cantidad ml a titular}}$$

- **Primer ensayo**

TABLA N° 01
Datos del primer ensayo

Muestra	Tiempo de fermentación(h)	Caldo de fermentación (ml)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	0	4	1.2	6.8	0.27
Muestra 2	0	4	1.3	6.8	0.29
Muestra 3	0	4	1.3	6.7	0.29
Muestra 4	0	4	1.3	6.7	0.29
Muestra 5	0	4	0.5	6.7	0.11

Fuente: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.2 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.27$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.29$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.29$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.29$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{0.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.11$$

- Segundo ensayo

TABLA N° 02
Datos del segundo ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	12	2.2	5	0.50
Muestra 2	4	12	2.4	5	0.54
Muestra 3	4	12	1.8	5.8	0.41
Muestra 4	4	12	1.8	5.8	0.41
Muestra 5 u	4	12	0.9	6	0.20

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.2 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.50$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.4 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.54$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.8 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.41$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.8 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.41$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{0.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.20$$

- Tercer ensayo

TABLA N° 03
Datos del tercer ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	24	3.5	4.7	0.79
Muestra 2	4	24	3.8	4.7	0.86
Muestra 3	4	24	2.7	5.8	0.61
Muestra 4	4	24	2.7	5.8	0.61
Muestra 5	4	0	1.8	5.8	0.41

f u e n t e : L o s a u t o r e s .

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.79$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.8 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.86$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.61$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.61$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{1.8 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.41$$

- Cuarto ensayo

TABLA N° 04
Datos del cuarto ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	36	4.2	4.5	0.95
Muestra 2	4	36	4.4	4.5	0.99
Muestra 3	4	36	3.6	5.5	0.81
Muestra 4	4	36	3.3	5.5	0.74
Muestra 5	4	36	2.1	5.8	0.47

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.2 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.95$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.4 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.99$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.6 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.81$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.74$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.47$$

- Quinto ensayo

TABLA N° 05
Datos del quinto ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	48	4.6	4.3	1.04
Muestra 2	4	48	4.9	4.3	1.10
Muestra 3	4	48	3.7	5.3	0.83
Muestra 4	4	48	3.4	5.3	0.77
Muestra 5	4	48	2.2	5.5	0.50

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.6 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.04$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.1$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.83$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.4 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.77$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = 2.2$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.50$$

- Sexto ensayo

TABLA N° 06
Datos del sexto ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	60	5.1	4.3	1.15
Muestra 2	4	60	6.9	4	1.55
Muestra 3	4	60	3.7	5	0.83
Muestra 4	4	60	3.6	5	0.81
Muestra 5	4	60	2.2	5.3	0.50

fente: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{5.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.15$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.55$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.83$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.6 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.81$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.2 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.50$$

- Séptimo ensayo

TABLA N° 07
Datos del séptimo ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	72	7.1	4	1.60
Muestra 2	4	72	7.7	3.8	1.73
Muestra 3	4	72	4.5	4.5	1.01
Muestra 4	4	72	4.9	4.5	1.10
Muestra 5	4	72	2.3	5.3	0.52

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{7.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.60$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{7.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.73$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.01$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.10$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.52$$

- Octavo ensayo

TABLA N° 08
Datos del octavo ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	84	7.6	3.8	1.71
Muestra 2	4	84	8.2	3.5	1.85
Muestra 3	4	84	4.9	4.5	1.10
Muestra 4	4	84	5.8	4.5	1.31
Muestra 5	4	84	2.7	4.8	0.61

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{7.6 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.71$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.2 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.85$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{4.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.10$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{5.8 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.31$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{2.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.61$$

- **Noveno ensayo**

TABLA N° 09
Datos del noveno ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	96	8.1	3.5	1.82
Muestra 2	4	96	9.1	3.5	2.05
Muestra 3	4	96	6.1	4.3	1.37
Muestra 4	4	96	6.1	4.3	1.37
Muestra 5	4	96	3.1	4.8	0.70

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.82$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.05$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.37$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.37$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.1 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.70$$

- Decimo ensayo

TABLA N° 10
Datos del decimo ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	108	8.3	3.5	1.87
Muestra 2	4	108	9.5	3.2	2.14
Muestra 3	4	108	6.6	4.3	1.49
Muestra 4	4	108	6.4	4.3	1.44
Muestra 5	4	108	3.2	4.5	0.72

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.87$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.14$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.6 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.49$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.4 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.44$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.2 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.72$$

- Decimo primer ensayo

TABLA N° 11
Datos del decimo primer ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	120	8.3	3.5	1.87
Muestra 2	4	120	9.5	3.2	2.14
Muestra 3	4	120	6.8	4	1.53
Muestra 4	4	120	6.5	4	1.46
Muestra 5	4	120	3.3	4.5	0.74

fente: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.87$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.14$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.8 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.53$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.46$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.74$$

- Decimo segundo ensayo

TABLA N° 12
Datos del decimo segundo ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	132	8.3	3.5	1.87
Muestra 2	4	132	9.5	3.2	2.14
Muestra 3	4	132	6.9	4	1.55
Muestra 4	4	132	6.7	4	1.51
Muestra 5	4	132	3.4	4.5	0.79

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.3 \cdot 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.87$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.5 \cdot 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.14$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.9 \cdot 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.55$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.7 \cdot 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.51$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.4 \cdot 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.79$$

- Decimo tercer ensayo

TABLA N° 13
Datos del decimo tercer ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	144	8.3	3.5	1.87
Muestra 2	4	144	9.5	3.2	2.14
Muestra 3	4	144	6.9	4	1.55
Muestra 4	4	144	6.7	4	1.51
Muestra 5	4	144	3.5	4.5	0.79

fente: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.87$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.14$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.55$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.51$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.79$$

- Decimo cuarto ensayo

TABLA N° 14
Datos del decimo cuarto ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	156	8.3	3.5	1.87
Muestra 2	4	156	9.5	3.2	2.14
Muestra 3	4	156	6.9	4	1.55
Muestra 4	4	156	6.7	4	1.51
Muestra 5	4	156	3.5	4.5	0.79

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.87$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.14$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.55$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.51$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.79$$

- Decimo quinto ensayo

TABLA N° 15
Datos del decimo quinto ensayo

Muestra	Caldo de fermentación (ml)	Tiempo de fermentación(h)	NaOH gastados (ml)	PH	% de acidez
Muestra 1	4	178	8.3	3.5	1.87
Muestra 2	4	178	9.5	3.2	2.14
Muestra 3	4	178	6.9	4	1.55
Muestra 4	4	178	6.7	4	1.51
Muestra 5	4	178	3.5	4.5	0.79

fuelle: Los autores.

Muestra 1

$$\% \text{ de acidez} = \frac{8.3 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.87$$

Muestra 2

$$\% \text{ de acidez} = \frac{9.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 2.14$$

Muestra 3

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.9 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.55$$

Muestra 4

$$\% \text{ de acidez} = \frac{6.7 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 1.51$$

Muestra 5

$$\% \text{ de acidez} = \frac{3.5 \times 0.009 \times 100}{4}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.79$$

CUADRO N°1**Fermentación de la muestra 1**

Ensayos	Tempo (h)	Caldo de Fermentación (ml)	NaOH gastado (ml)	PH	% de acidez
1	0	4	1.2	6.8	0.27
2	12	4	2.2	5	0.50
3	24	4	3.5	4.7	0.79
4	36	4	4.2	4.5	0.95
5	48	4	4.6	4.3	1.04
6	60	4	5.1	4.3	1.15
7	72	4	7.1	4	1.60
8	84	4	7.6	3.8	1.71
9	96	4	8.1	3.5	1.82
10	108	4	8.3	3.5	1.87
11	120	4	8.3	3.5	1.87
12	132	4	8.3	3.5	1.87
13	144	4	8.3	3.5	1.87
14	156	4	8.3	3.5	1.87
15	178	4	8.3	3.5	1.87

Fuente: los autores

CUADRO N° 2**Fermentación de la muestra 2**

Ensayos	Tempo (h)	Caldo de Fermentación (ml)	NaOH gastado (ml)	PH	% de acidez
1	0	4	1.3	6.8	0.29
2	12	4	2.4	5	0.54
3	24	4	3.8	4.7	0.86
4	36	4	4.4	4.5	0.99
5	48	4	4.9	4.3	1.10
6	60	4	6.9	4	1.55
7	72	4	7.7	3.8	1.73
8	84	4	8.2	3.5	1.85
9	96	4	9.1	3.5	2.05
10	108	4	9.5	3.2	2.14
11	120	4	9.5	3.2	2.14
12	132	4	9.5	3.2	2.14
13	144	4	9.5	3.2	2.14
14	156	4	9.5	3.2	2.14
15	178	4	9.5	3.2	2.14

Fuente: los autores

CUADRO N°3**Fermentación de la muestra 3**

Ensayos	Tempo (h)	Caldo de Fermentación (ml)	NaOH gastado (ml)	PH	% de acidez
1	0	4	1.3	6.7	0.29
2	12	4	1.8	5.8	0.41
3	24	4	2.7	5.8	0.61
4	36	4	3.6	5.5	0.81
5	48	4	3.7	5.3	0.83
6	60	4	3.7	5	0.83
7	72	4	4.5	4.5	1.01
8	84	4	4.9	4.5	1.10
9	96	4	6.1	4.3	1.37
10	108	4	6.6	4.3	1.49
11	120	4	6.8	4	1.53
12	132	4	6.9	4	1.55
13	144	4	6.9	4	1.55
14	156	4	6.9	4	1.55
15	178	4	6.9	4	1.55

Fuente: los autores

CUADRO N°4**Fermentación de la muestra 4**

Ensayos	Tempo (h)	Caldo de Fermentación (ml)	NaOH gastado (ml)	PH	% de acidez
1	0	4	1.3	6.7	0.29
2	12	4	1.8	5.8	0.41
3	24	4	2.7	5.8	0.61
4	36	4	3.3	5.5	0.74
5	48	4	3.4	5.3	0.77
6	60	4	3.6	5	0.81
7	72	4	4.9	4.5	1.10
8	84	4	5.8	4.5	1.31
9	96	4	6.1	4.3	1.37
10	108	4	6.4	4.3	1.44
11	120	4	6.5	4	1.46
12	132	4	6.7	4	1.51
13	144	4	6.7	4	1.51
14	156	4	6.7	4	1.51
15	178	4	6.7	4	1.51

Fuente: los autores

CUADRO N°5**Fermentación de la muestra 5**

Ensayos	Tempo (h)	Caldo de Fermentación (ml)	NaOH gastado (ml)	PH	% de acidez
1	0	4	0.5	6.7	0.11
2	12	4	0.9	6	0.20
3	24	4	1.8	5.8	0.41
4	36	4	2.1	5.8	0.47
5	48	4	2.2	5.5	0.50
6	60	4	2.2	5.3	0.50
7	72	4	2.3	5.3	0.52
8	84	4	2.7	4.8	0.61
9	96	4	3.1	4.8	0.70
10	108	4	3.2	4.8	0.72
11	120	4	3.3	4.5	0.74
12	132	4	3.4	4.5	0.77
13	144	4	3.5	4.5	0.79
14	156	4	3.5	4.5	0.79
15	178	4	3.5	4.5	0.79

Fuente: los autores

**PORCENTAJES DE ACIDEZ DE LOS 6 ULTIMOS ENSAYOS DE CADA MUESTRA
CUADRO N° 6**

MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	MUESTRA 4	MUESTRA 5
1.87	2.14	1.49	1.44	0.72
1.87	2.14	1.53	1.46	0.74
1.87	2.14	1.55	1.51	0.77
1.87	2.14	1.55	1.51	0.79
1.87	2.14	1.55	1.51	0.79
1.87	2.14	1.55	1.51	0.79

Fuente: los autores

- ni total:

$$N = 6 + 6 + 6 + 6 + 6 = 30$$

- K=5
- n:6
- T_j: 46.82

Sumatoria de los 6 últimos resultados de porcentajes de acidez obtenidos con la muestra 1

$$Suma = 1.87 + 1.87 + 1.87 + 1.87 + 1.87 + 1.87 = 11.22$$

Sumatoria de los 6 últimos resultados de porcentajes de acidez obtenidos con la muestra 2

$$Suma = 2.14 + 2.14 + 2.14 + 2.14 + 2.14 + 2.14 = 12.84$$

Sumatoria de los 6 últimos resultados de porcentajes de acidez obtenidos con la muestra 3

$$Suma = 1.49 + 1.53 + 1.55 + 1.55 + 1.55 + 1.55 = 9.22$$

Sumatoria de los 6 últimos resultados de porcentajes de acidez obtenidos con la muestra 4

$$Suma = 1.44 + 1.46 + 1.51 + 1.51 + 1.51 + 1.51 = 8.94$$

Sumatoria de los 6 últimos resultados de porcentajes de acidez obtenidos con la muestra 5

$$Suma = 0.72 + 0.74 + 0.77 + 0.79 + 0.79 + 0.79 = 4.6$$

Suma Total:

$$T, j = 11.22 + 12.84 + 9.22 + 8.94 + 4.6 = 46.82$$

ANAVA POR DCA

Usando una variable de significancia de $\alpha=0,05$

- Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$

Ha: Al menos un μ es diferente de los demás. $i=1, 2, 3, 4, 5$

- Suma total de cuadrados:

$$\begin{aligned} SC &= 1.87^2 + 1.87^2 + 1.87^2 + 1.87^2 + 1.87^2 + 1.87^2 + 2.14^2 + 2.14^2 + 2.14^2 + 2.14^2 \\ &\quad + 2.14^2 + 2.14^2 + 1.49^2 + 1.53^2 + 1.55^2 + 1.55^2 + 1.55^2 + 1.55^2 \\ &\quad + 1.44^2 + 1.46^2 + 1.51^2 + 1.51^2 + 1.51^2 + 1.51^2 + 0.72^2 + 0.74^2 \\ &\quad + 0.77^2 + 0.79^2 + 0.79^2 + 0.79^2 = 79.487 \end{aligned}$$

$$SCT = 79.487 - \frac{46.82^2}{30} = 6.4166$$

- Suma de cuadrados dentro de los grupos, TRATAMIENTOS:

$$SC = 11.22^2 + 12.84^2 + 9.22^2 + 8.94^2 + 4.6^2 = 476.846$$

$$SCt = \frac{476.846}{6} - \frac{46.82^2}{30} = 6.4039$$

- Suma de cuadrados entre los grupos, error:

$$SCE = 6.4166 - 6.4039 = 0.01268$$

- Grados de Libertad:

De tratamiento: $5-1=4$

De error: $30-5=25$

Total: $25+4=29$

- Cuadrados medios:

De tratamiento:

$$CMt = \frac{6.4039}{5-1} = 1.6009$$

De error:

$$CME = \frac{0.01268}{30 - 5} = 0.0005072$$

- Cálculo de Fc o Rv:

$$Fc = \frac{1.6009}{0.0005072} = 3156.34$$

- Cálculo de Ft:

Por tabla encontramos

$$F(0,95;4;25)=2.76$$

- Criterio Decisivo:

Se acepta H_0 si $F_c < F_T$

Se rechaza H_0 si $F_c > F_T$

$F_T=2.76$

Esto nos dice que podemos rechazar la H_0 porque:

$$3156.34 > 2.76$$

Por lo tanto podemos afirmar que existe Significancia en al menos un valor los porcentajes de acidez por fermentación de las 5 muestras.

**PRODUCCION DE ACIDO LACTICO POR LITRO DE SUERO DE LECHE
CUADRO N° 7**

	PRODUCCION DE LACTOSA	PORCENTAJE DE ACIDEZ
MUESTRA 1	53.5	1.87
MUESTRA 2	93.6	2.14
MUESTRA 3	19	1.55
MUESTRA 4	11.6	1.51
MUESTRA 5	0	0.79

Para la fermentación se utilizó 5 gr de lactosa cristalizada de cada muestra, hidrolizándola y suplementándola resultó un caldo de fermentación total de 110ml.

5gr lactosa \longrightarrow **110ml caldo**

Muestra 1

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml de caldo de la muestra} \times \text{gr de lactosa por litro de suero}}{5\text{gr de lactosa de la muestra}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml} \times 53.5\text{gr}}{5\text{gr}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = 1177\text{ml}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{\text{caldo de la muestra por litro} \times \text{porcentaje de acidez}}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{1177 \times 1.87}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = 22.0099$$

Muestra 2

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml de caldo de la muestra} \times \text{gr de lactosa por litro de suero}}{5\text{gr de lactosa de la muestra}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml} \times 93.6\text{gr}}{5\text{gr}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = 2059.2\text{ml}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{\text{caldo de la muestra por litro} \times \text{porcentaje de acidez}}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{2059.2 \times 2.14}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = 44.0668$$

Muestra 3

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml de caldo de la muestra} \times \text{gr de lactosa por litro de suero}}{5\text{gr de lactosa de la muestra}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml} \times 19\text{gr}}{5\text{gr}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = 418\text{ml}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{\text{caldo de la muestra por litro} \times \text{porcentaje de acidez}}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{418 \times 1.55}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = 6.479$$

Muestra 4

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml de caldo de la muestra} \times \text{gr de lactosa por litro de suero}}{5\text{gr de lactosa de la muestra}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = \frac{110\text{ml} \times 11.6\text{gr}}{5\text{gr}}$$

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = 255.2\text{ml}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{\text{caldo de la muestra por litro} \times \text{porcentaje de acidez}}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{255.2 \times 1.51}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = 3.8535$$

Muestra 5

$$\text{caldo de fermentacion por litro de suero} = 1100\text{ml}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{\text{caldo de la muestra por litro} \times \text{porcentaje de acidez}}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = \frac{1100 \times 0.79}{100}$$

$$\text{cantidad de acido lactico} = 8.69$$

	PRODUCCION DE LACTOSA	PORCENTAJE DE ACIDEZ	PRODUCCION DE ACIDO LACTICO
MUESTRA 1	53.5	1.87	22.0099
MUESTRA 2	93.6	2.14	44.06688
MUESTRA 3	19	1.55	6.479
MUESTRA 4	11.6	1.51	3.85352
MUESTRA 5	0	0.79	8.69

CAPITULO IX: ANEXOS

ANEXO 1: Aislamiento del *Lactobacillus Bulgaricus* del yogurt

Día 1: Para el aislamiento de BAL del Yogurt comercial, se enriquecerán durante 24 hs. a 30 °C, en condiciones de microaerofilia, en MRS suplementado con 100 mg/L de cicloheximida, para evitar el crecimiento de levaduras.

Día 2: El enriquecimiento será luego sembrado en placas de MRS. También en microaerofilia a 28 °C.

Día 3: Mediante análisis de colonias, tinción de gram y reacción a la catalasa se seleccionaron las BAL. Las colonias seleccionadas repicarán a fin de obtener cultivos puros de cada aislamiento de BAL (cocos y bacilos GRAM positivos, catalasa negativos), que se conservaron en caldo MRS con 30% de glicerol a -20 °C y -80 °C para luego realizar su identificación.

Día 4: Para proceder a la identificación bacteriana, se extraerá ADN total de las cepas. Para ello las células se cultivaron hasta fase exponencial, se centrifugaron (5,000 x g, 15 min, 4 °C), se lavaron dos veces en Tris/ EDTA (1M, pH 7,0) y se re-suspenderán en 1 ml de lisozima Tris-EDTA (20 mg/mL), incubándose durante 2 h a 37 °C. Tras la adición de 0,1 mg/mL de proteinasa K las células se mantendrán durante 1 h a 56 °C, luego se adiciona sarcosyl 1,5% y se incuba a 65 °C durante 5 min. Por último, se realizó del ADN mediante columna de afinidad. El ADN obtenido se visualiza en un gel de agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio, en presencia de un ladder 400 pb, para controlar su integridad.

La identificación de los aislamientos se realizará mediante PCR-RFLP consistente en la amplificación mediante PCR de un fragmento de 294 pb del gen *rpoB*, que codifica para la subunidad beta del ARN polimerasa, y posterior digestión del amplicón con las enzimas Hinf I y Aci I.

Para caracterizar a las bacterias aisladas, se evaluará la fermentación homo y heteroláctica mediante la siembra de los cultivos aislados en Medio McDonal y la actividad actividad maloláctica

Mediante el Kit MegaQuant TM K/LMALMQ 12/05.

Medio de cultivo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960)

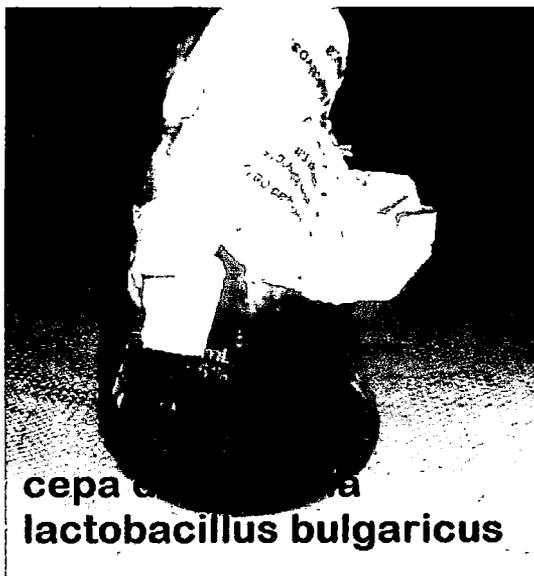
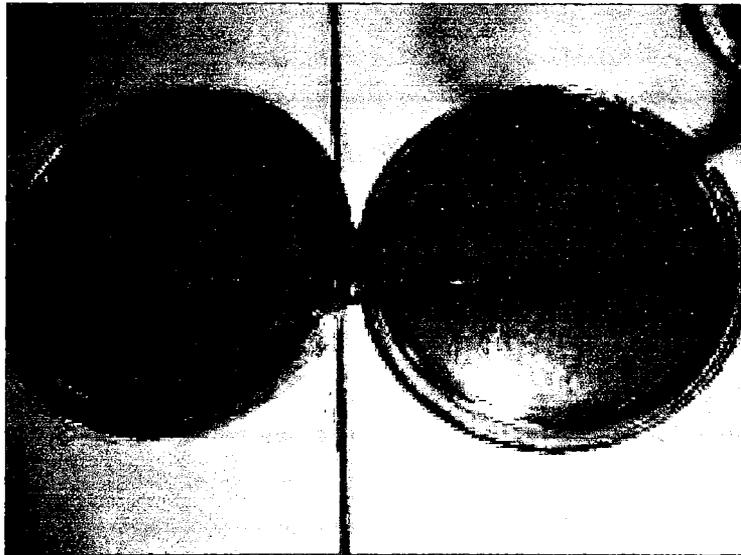
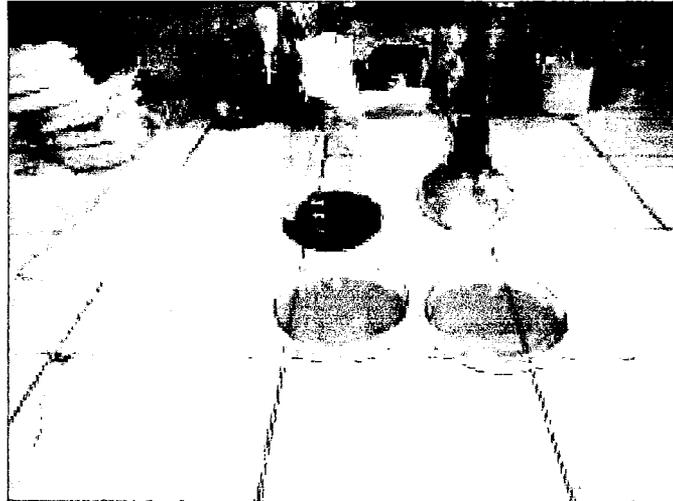
Fórmula (en gramos por litro)	
Proteosa peptona	10.0
Nº3	
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitan	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	13.0
pH final: 6.4± 0.2	

Medio de Cultivo Agar APT (McDonald et al, 1987)

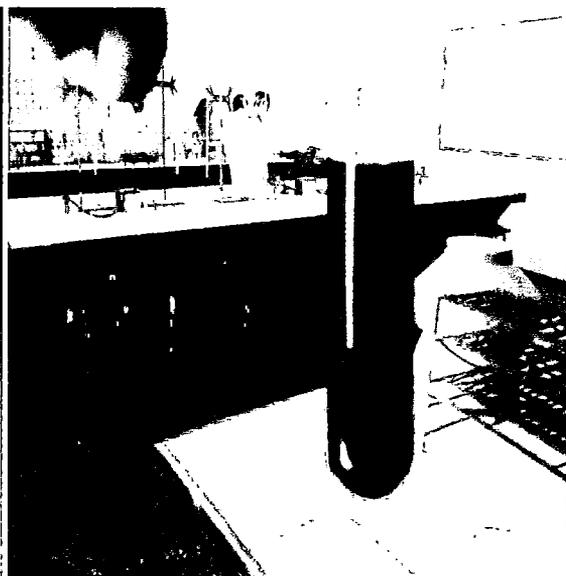
Fórmula (en gramos por litro)

Cloruro de Mg	0.14
NaCl	5
citrato de Na	5
Glucosa	10
Polisorbato	80.02
Sulfato de Mg	0.898
Agar	15

pH= 6.7



cepa *Lactobacillus bulgaricus*



ANEXO 2: *Lactobacillus bulgaricus*

Appl Microbiol Biotechnol (1995) 42:826–829

© Springer-Verlag 1995

ORIGINAL PAPER

S. Benthin · J. Villadsen

Production of optically pure D-lactate by *Lactobacillus bulgaricus* and purification by crystallisation and liquid/liquid extraction

Received: 25 April 1994 / Received revision: 27 August 1994 / Accepted: 12 September 1994

Abstract Optically pure D-lactic acid was produced by fermentation of lactose with *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12, and purified by crystallisation as magnesium D-lactate followed by extraction with butanol. The yield of D-lactate and contaminations with nitrogen and phosphorus were mapped during the purification procedure. The overall yield of D-lactic acid was 72% and the purity was more than 99%. Contaminations in the final D-lactic acid with nitrogen, phosphorus and L-lactic acid were only 0.032% w/w, 0.018% w/w and 0.04% w/w respectively.

Introduction

Lactic acid is a chiral molecule that exists as two stable optical isomers. L-(+)-Lactic acid is the normal intermediate in mammalian metabolism and is commonly referred to as the physiological isomer. For applications in the food industry the L isomer is therefore preferred. D(-)-Lactic acid is produced by many microorganisms and particularly some lactic acid bacteria produce lactic acid with a large fraction of this isomer.

Enzymes that act on lactic acid are often specific for one isomer or have different affinities for the two isomers. Optically pure lactic acids are therefore important for bio-applications, e.g. in studies of lactic acid inhibition and as standards for enzymatic lactic acid analysis. The physical properties of lactic acid also depend on the isomeric composition (Vickroy 1985), and properties of biodegradable plastics produced from lactic

acid depend on the isomeric composition of the lactic acid (Wehrenberg 1981). Industrial applications of optically pure D-lactic acid are mainly in the plastics industry and in the pharmaceutical industry.

For production of optically pure lactic acid it is better to use a direct microbial synthesis of the pure isomer rather than to attempt resolution of a racemic mixture with strychnine (Purdie and Walker 1892) or fractional crystallisation (Pederson et al. 1926). Lactococci produce L-lactic acid with no contamination of the D-isomer. Likewise, several *Lactobacillus bulgaricus* strains produce optically pure D-lactic acid. To prepare lactic acid with a specified isomeric composition it has been suggested that a mixed bacterial culture should be applied for the fermentation (Dainippon Ink. & Chem. Kk. 1993). It is, however, more expedient to blend the lactic acid from the two optically pure lactic acids.

Several methods are available for purification of lactic acid from fermentation media. The classical methods are based on precipitation, extraction, or distillation (Peckham 1944; Smith and Claburn 1939; Vaccari et al. 1993; Lazarova and Peeva 1994). Recently methods based on ion-exchange (Vaccari et al. 1993) or electro-dialysis (Hongo et al. 1986; Boyaval et al. 1987) have been investigated. Most industrial procedures comprise a precipitation of lactic acid as the Ca salt. As the first step in the procedure described in the present work lactic acid is precipitated as the Mg salt since this has a larger difference between solubilities at 0°C and 100°C. Butanol has been chosen as the solvent for extraction because it is not as hazardous as other suitable solvents, e.g. isopropyl ether.

In the present work a simple method is described for production and purification of optically pure D-lactic acid. Each step of the purification is documented by the yield of D-lactic acid and purity of the D-lactic acid by measurement of the elements N and P. The procedure has been developed with emphasis on simplicity and to be used for laboratory scale preparations of about 1 kg D-lactic acid. The procedure could equally well be applied for purification of L-lactic acid.

S. Benthin (✉)
Fermentation Department, Chr. Hansen A/S, Bøge Allé 10,
2970 Hørsholm, Denmark. Fax: +45 4576 5455

J. Villadsen
Department of Biotechnology, Technical University of
Denmark, Building 223, 2800 Lyngby, Denmark

Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398

Catherine Beal, Philippe Louvet, and Georges Corrieu

Laboratoire de Génie des Procédés Biotechnologiques Agro-Alimentaires, INRA, F-78850 Thiverval-Grignon, France

Summary. The effect of pH and temperature on the growth and acidification characteristics of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398 were studied in order to optimize starter production. A quadratic two-variable model for each of these parameters is proposed. Optimal growth conditions were found at pH 6.5 and 40°C for *S. thermophilus* and pH 5.8 and 44°C for *L. bulgaricus*. Maximum acidification was obtained at pH values and temperatures higher than the optimal growth conditions. In addition, the two strains were generally more sensitive to pH effect.

Introduction

Thermophilic lactic acid bacteria are widely used in the dairy industry for manufacturing cheeses (emmental and gruyere) and fermented milk products such as yoghurts (Martley 1983).

Industrial starters are currently produced in pure cultures. Mixtures of a variable number of strains are then prepared to furnish the mixed starters regularly used (Stadhouders and Leenders 1984). In order to optimize starter production in fermentors, it is important to determine the effects of operating conditions on yields and kinetic parameters of the cultures. According to Tayeb et al. (1984), pH and temperature are important operating factors for *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, strains used to manufacture yoghurt. Several authors (Accolas et al. 1977; Martley 1983; Radke-Mitchell and Sandine 1986; Robinson 1988) have defined optimal growth and/or acidification temperatures of these strains

in tests generally carried out in milk and without pH control. These conditions are somewhat different from those used in starter production, which requires automatic pH control. The optimal temperatures proposed (between 35° and 46° C for *S. thermophilus* and between 42° and 50° C for *L. bulgaricus*) correspond to wide ranges which cannot be explained by behaviour differences between the strains. Little work has been done on the optimum pH for the growth of these two bacteria although Tayeb et al. (1984) recommended pH values of 6.5 and 5.5 for *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* respectively.

The present work was carried out with pure cultures at controlled pH and temperature. It defines the influence of these two parameters on the growth characteristics of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398, as well as on the production of the resulting lactic acid. An experimental design enabled the respective effects of each of the two parameters to be detected.

Materials and methods

Strains and culture medium. The strains used were *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398, from the collection of the Centre National de Recherches Zootechniques (CNRZ), Jouy-en-Josas, France.

Inocula were prepared from a pure culture at controlled pH and temperature (pH=6.5, T=40°C for *S. thermophilus* and pH=5.8, T=44°C for *L. bulgaricus*). They were harvested at the end of exponential growth, frozen and stored at -75°C. They were thawed at 40°C 1 h before inoculation which was then carried out at a concentration of about 10 bacterial/ml.

The culture medium was composed of mild whey (Bel Industrie, Paris, France) at 60 g/l, lactose (Prolabo, Paris, France) at 40 g/l, Bactopeptone (Difco, Detroit, Mich, USA) at 5 g/l, yeast extract (Difco) at 5 g/l and antifoam (Rhodorsil 426 R, Prolabo) at 1 ml/l. It was sterilized in the fermentor at 110°C for 20 min.

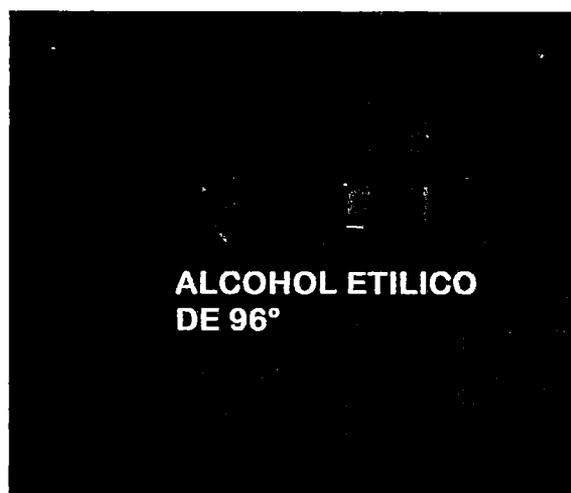
Offprint requests to: C. Beal

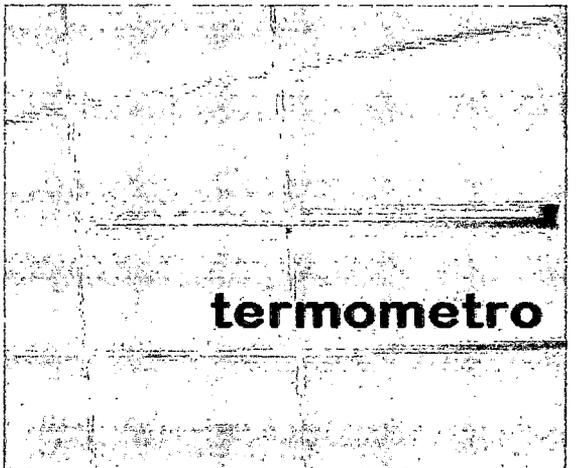
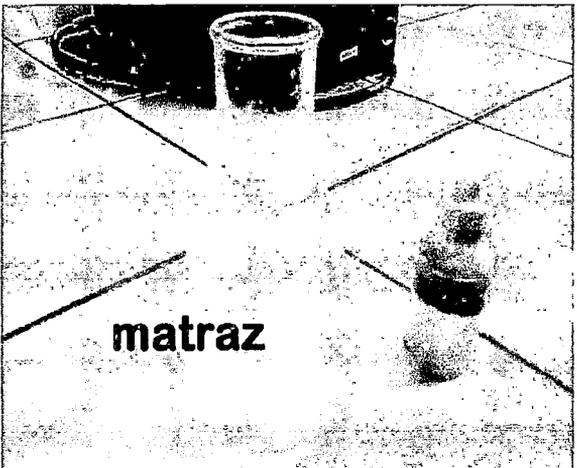
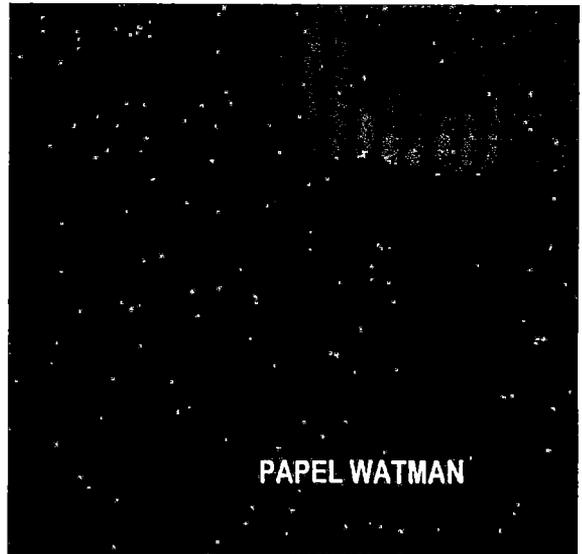
ANEXO 3: Fotos de la Fase experimental

PRODUCCIÓN DE LACTOSA

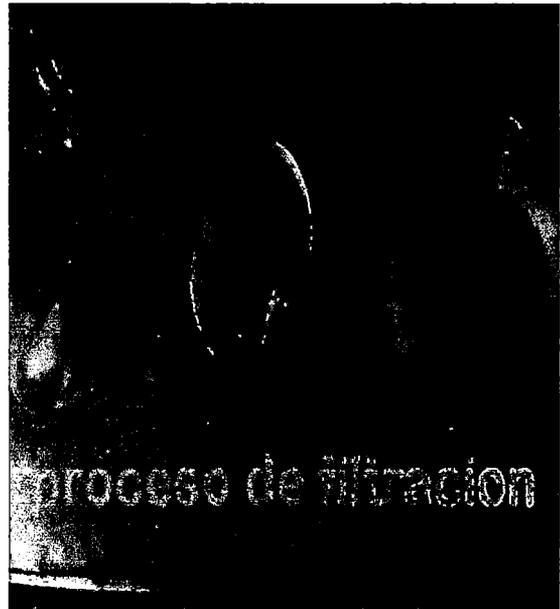
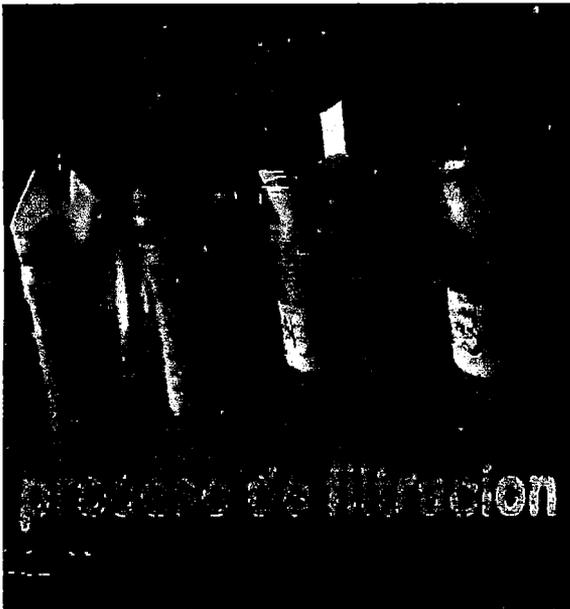
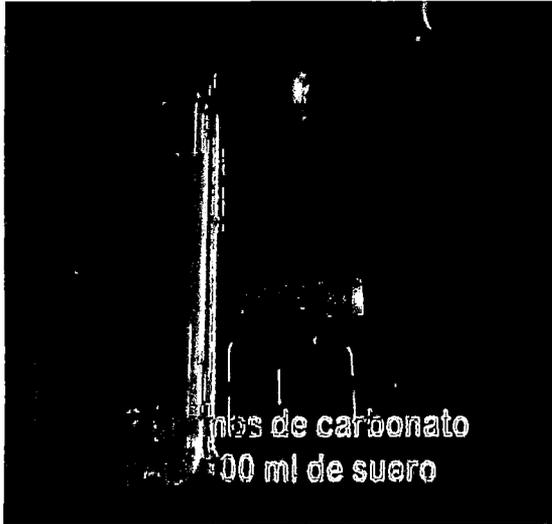


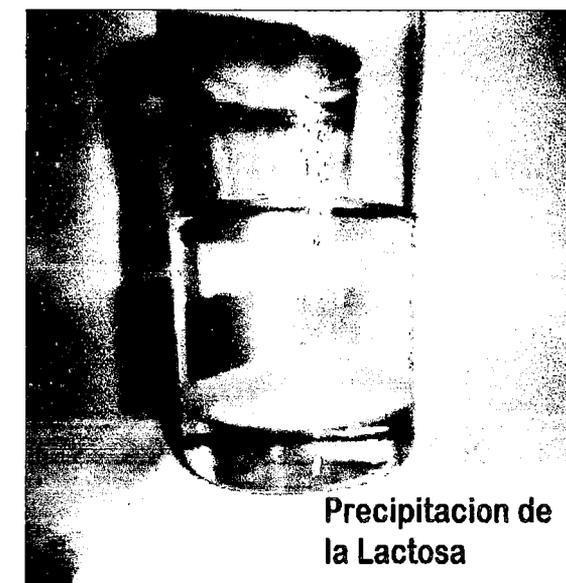
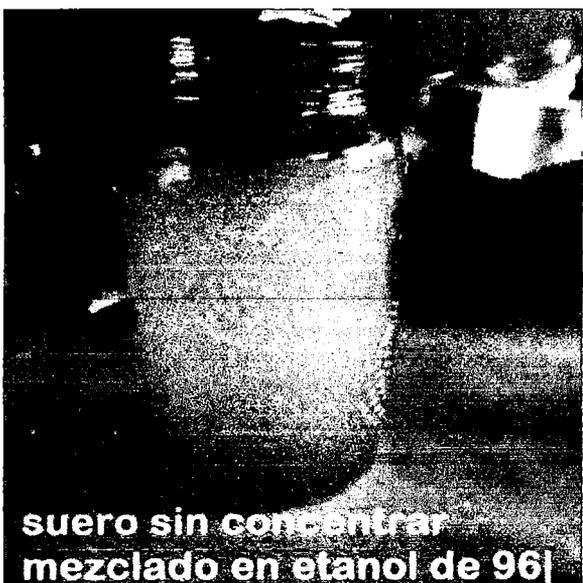
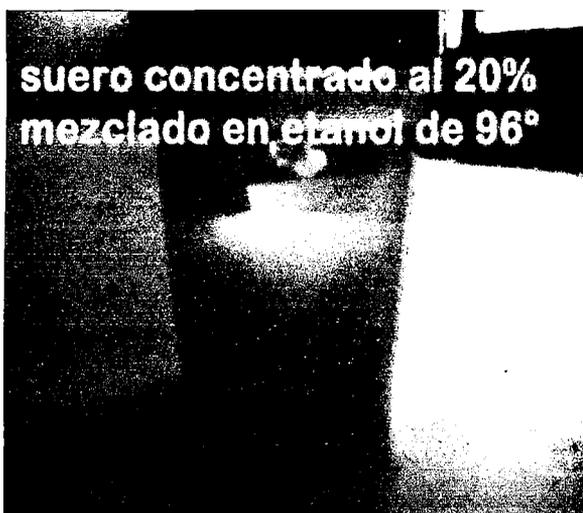
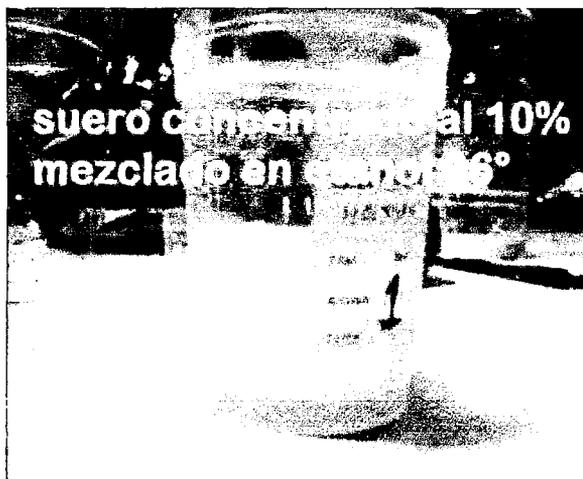
Materiales y reactivos





Proceso

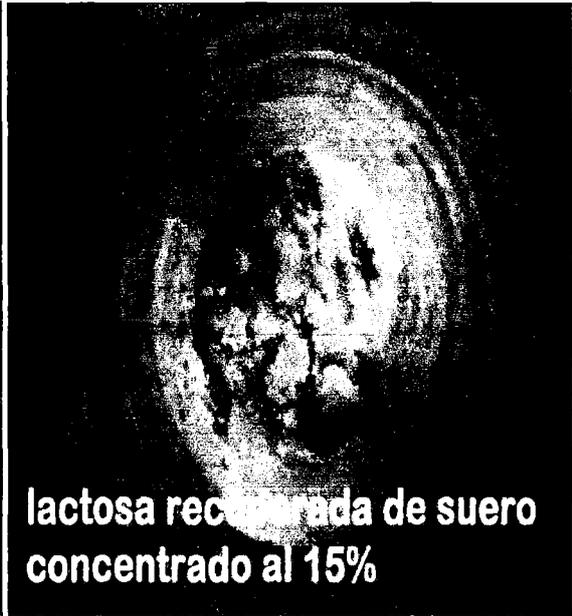




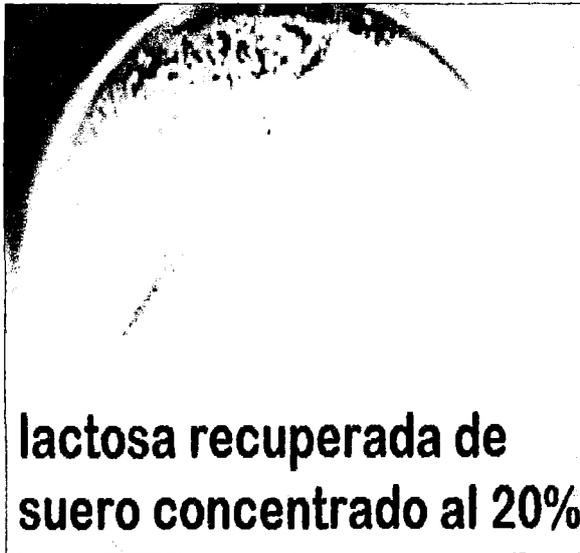
**lactosa recuperada de
suero concentrado al 10%**



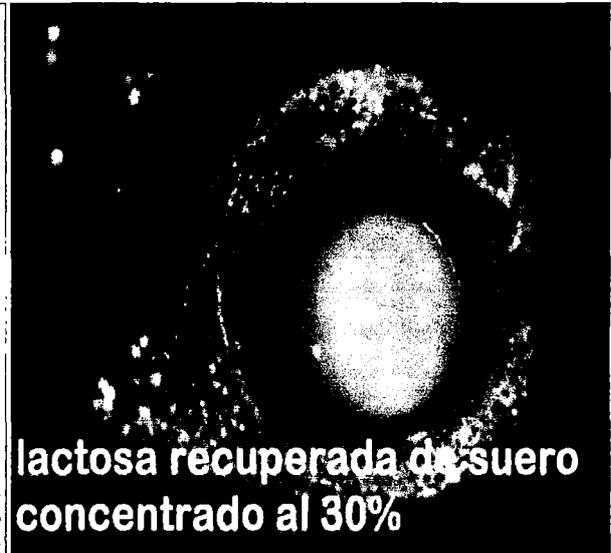
**lactosa recuperada de suero
concentrado al 15%**



**lactosa recuperada de
suero concentrado al 20%**



**lactosa recuperada de suero
concentrado al 30%**

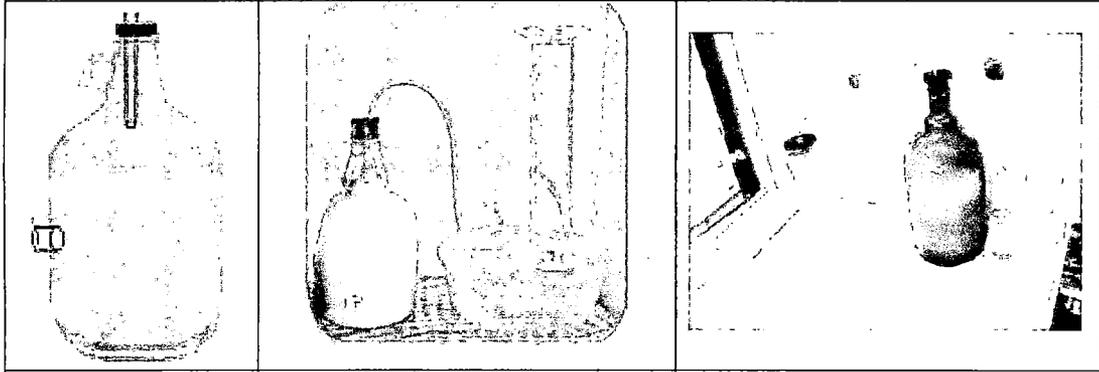


IDENTIFICACION DE LA LACTOSA POR LA PRUEVA DE AZUCARES REDUCTORES



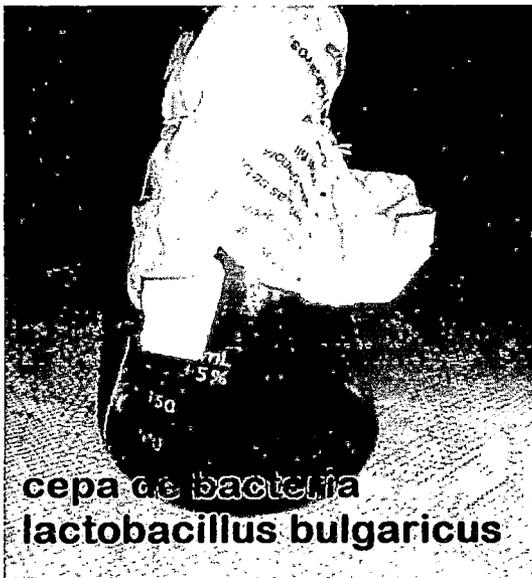
Producción De Acido Lactico

Diseño, Construcción y Esterilización del Biorreactor Columna de Burbujeo

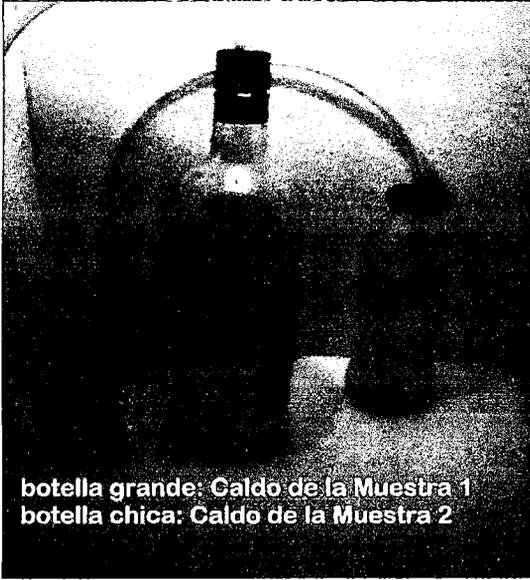


Esterilización del biorreactor: con flujo de vapor de agua a 100°C durante 15 - 30 min
Esterilizar accesorios (cánulas y tapones) con hipoclorito de sodio 5.25 % durante 5 días

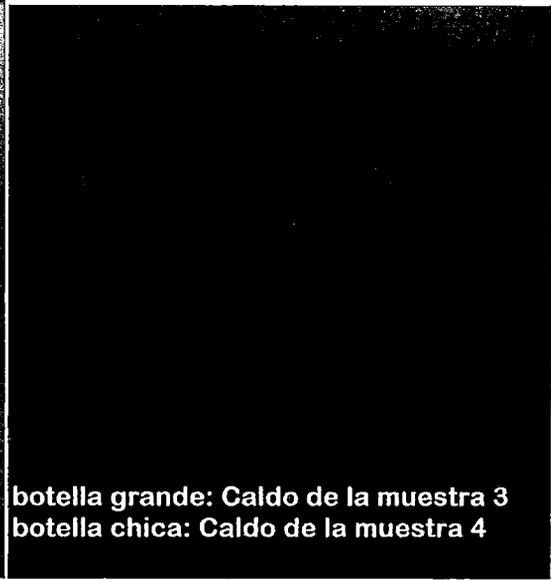
MATERIALES Y REACTIVOS



PROCESO



botella grande: Caldo de la Muestra 1
botella chica: Caldo de la Muestra 2



botella grande: Caldo de la muestra 3
botella chica: Caldo de la muestra 4



botella grande: Caldo de la muestra 5

titulacion con hidroxido de sodio 0.1N



ANEXO 4: Tablas estadísticas

TABLA N° 02 B

Percentiles de la distribución F

F_{95}									
Grados de libertad del denominador	Grados de libertad del numerador								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234	236,8	238,5	240,5
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,7	2,65
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42
20	4,35	3,49	3,10		2,71	2,60	2,51	2,45	2,39
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,45	2,40	2,34
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88