



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)

Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Presenta:
I.B.Q Amelia Ríos Castro

Dirigido por:
Dr. Eduardo Castaño Tostado

C.U. Querétaro, Qro, México. Octubre 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q Amelia Ríos Castro

Dirigido por:

Dr. Eduardo Castaño Tostado

SINODALES

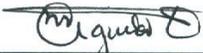
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Presidente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Secretario

Dr. Carlos Regalado González
Vocal

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Suplente

Dra. Blanca García Almendárez
Suplente



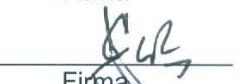
Q.B. Magali Aguilar Ortiz
Director de la Facultad



Firma



Firma



Firma



Firma



Firma



Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2011
México

RESUMEN

El ácido láctico es utilizado en la industria alimentaria como acidulante, conservador, saborizante y agente controlador de pH o inhibidor de deterioro bacteriano. Puede ser producido por fermentación de subproductos provenientes de procesos alimenticios; entre los que destaca el suero lácteo debido a la gran cantidad de lactosa que contiene, la cual es una buena fuente para el crecimiento de *Lactobacillus casei*. La tecnología de membranas de nanofiltración ha demostrado ventajas en el área de la filtración y separación, puede ser aplicada para separar, concentrar y purificar ácidos orgánicos. Por otra parte, la modelación matemática de procesos biológicos es una herramienta que resulta muy útil para estudiar el comportamiento de un sistema. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la producción y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante la tecnología de membrana. Se estudiaron las mejores condiciones de crecimiento para *Lb. casei* (ATCC334) usando diferentes concentraciones de lactosa (20, 30, 40 50 g/L) en el suero lácteo suplementado y diferentes porcentajes de inóculo inicial (1, 5, 10, 20) en dos fases de crecimiento, exponencial y estacionaria. Las fermentaciones para la producción de ácido láctico se realizaron en un proceso tipo lote a diferente pH. Las mejores condiciones para el crecimiento de *Lb. casei* fueron 50 g/L de sustrato con 1% de inóculo en fase estacionaria o 1% de inóculo en fase exponencial, con estas condiciones se alcanzaron alrededor de 9.3 log UFC/ml después de 18 h. La fermentación realizada a pH de 6.0 logró la mayor productividad (2.08 g/L h) y la mayor cantidad de biomasa y de ácido láctico, 1.15 g/L y 25.01±0.27 g/L, respectivamente. Se probaron dos membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico (CK y TFC-SR3) y su funcionamiento fue evaluado mediante la recuperación de ácido láctico y lactosa en el permeado. La membrana CK tuvo una alta recuperación de ambos compuestos, lactosa (83.70%) y ácido láctico (88.77%), por otro lado, la membrana TFC-SR3 mostró una baja recuperación de lactosa (4.11%) y un alto porcentaje de ácido láctico (75.07%). Se aplicó un modelo matemático propuesto por Altiok *et al.* (2006) a los datos experimentales; dicho modelo no logró un buen ajuste para la formación de biomasa, formación de producto y consumo de sustrato, por ello fue necesario estudiar modelos adicionales. Los resultados sugieren que el suero lácteo suplementado es un buen sustrato para el crecimiento de *Lb. casei* y producción de ácido láctico y que la tecnología de nanofiltración puede ser usada para concentrar y purificar el ácido láctico.

(Palabras clave: ácido láctico, suero lácteo, *Lb. casei*, membrana de nanofiltración.)

SUMMARY

The lactic acid is used in the food industry as an acidulant, preservative, flavoring and pH buffering agent or inhibitor of bacterial spoilage. It can be produced by fermentation from food processing industry wastes; among them, the milk whey is stands out because its high quantity of lactose, which is an excellent source for *Lactobacillus casei* growth. The nanofiltration membranes technology has demonstrated advantages in the area of filtration and separation, it can be applied in order to separate, concentrate and purify organic acids. On the other hand, the mathematical modelling of biological processes is a useful tool for studying systems behavior. The aim of this study was to characterize the lactic acid production and separation by fermentation from milk whey using the membrane technology. The best conditions for *Lb. casei* (ATCC334) growth were studied using different concentrations of lactose in the supplemented milk whey (20, 30, 40 50 g/L) and different percentages of initial inoculum (1, 5, 10, 20) in two growth stages, exponential and stationary. The fermentations for lactic acid were carried out in batch processes at different pH. The best conditions for *Lb. casei* growth were 50 g/L with 1% of inoculum in stationary stage or 1% of inoculum in exponential stage, with these conditions 9.3 log (UFC/ml) were reached after 18 h. The fermentation obtained at pH 6.0 attained the highest yield (2.08 g/L h) and the highest quantities of biomass and lactic acid 1.15 g/L y 25.01 ± 0.27 g/L respectively. Two nanofiltration membranes (CK y TFC-SR3) were tested for lactic acid separation and their performance was evaluated trough the lactic acid and lactose recovered in the permeate. The CK membrane had a high recovery for both, lactose (83.70%) and lactic acid (88.73%), otherwise, the TFC-SR3 membrane showed a low lactose recovery (4.11%) and a high lactic acid recovery (75.07%). A mathematical model proposed by Altioik *et al.*, (2006) was applied to the experimental data, this model did not achieve a good fitting for the microbial growth, product formation and substrate consumption, hence, the study of additional models was necessary. The results suggest that supplemented milk whey is a good substrate for *Lb. casei* growth and lactic acid production and that membrane technology can be used for lactic acid concentration and purification.

(Key words: lactic acid, milk whey, *Lb. casei*, nanofiltration membrane.)

DEDICATORIA

A mis padres, Maria de la Luz y Miguel,

gran ejemplo de vida...

A ti...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente este logro a los seres que me han dado la vida, mis padres: María de la Luz y Miguel. Quienes han estado dispuestos a dar todo por mí. Ambos son el mayor ejemplo de lucha y esfuerzo que pueda poseer. Gracias por todo, por apoyarme en mis decisiones, compartir mis alegrías y tristezas y por ser siempre un motivo de inspiración para mi vida. Tal vez no existen palabras que pueden definir lo que significan para mí. LOS AMO. Gracias por todo el amor, el apoyo y la confianza incondicional que siempre me han tenido, este triunfo también es suyo.

Al Dr. Eduardo Castaño, gracias por haberme aceptado como su alumna, por sus enseñanzas, por su buena asesoría durante la realización de este proyecto a través de estos dos años y por ayudarme a concluir mi trabajo de tesis satisfactoriamente.

Al Dr. Carlos Regalado y a la Dra. Blanca García, gracias por brindarme su apoyo, por permitirme trabajar en sus laboratorios cuando lo requerí y por sus siempre valiosas aportaciones para la mejora de este trabajo.

A la Dra. Silvia Amaya, por todo el apoyo ofrecido y facilidades otorgadas a lo largo de este periodo para llevar a cabo el trabajo experimental y ayudarme a hacer posible la estancia de investigación en el extranjero.

A la Dra. Sofía Arvizú, por el soporte brindado en la parte microbiológica del presente proyecto y por su disposición incondicional mostrado hacia este proyecto en todo momento.

A la Dra. Ana Bertha Cardador, por permitirme trabajar en su equipo de HPLC, el cual fue de suma importancia para el análisis de mis muestras.

Al Dr. Lech Ozimek, por haberme aceptado en su laboratorio de la Universidad de Alberta, Canadá y de esta forma, además de permitirme concluir mi parte experimental, tuve la oportunidad de vivir una gran experiencia de mucho aprendizaje académico, cultural y personal.

A Juan Manuel, mil gracias por acompañarme durante esta importante etapa de mi vida, y por estar siempre dispuesto a brindarme tu apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros de la maestría, generación 2009-2011, gracias por haber compartido esta inolvidable experiencia, los quiero...

A todo el personal administrativo del posgrado, en verdad que son parte esencial para que la elaboración de un trabajo de tesis concluya apropiadamente.

A todos aquellos que se me ha olvido mencionar, pero que hicieron posible de alguna u otra forma y que ayudaron para que la realización de este trabajo de investigación se llevara a cabo de manera satisfactoria, mil gracias. Finalmente hemos terminado....

Amelia Ríos Castro

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
SUMMARY	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Ácido Láctico	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Usos	4
2.1.3 Procesos de Producción	5
2.1.4 Producción Mundial	6
2.2 Suero lácteo	7
2.2.1 Definición	7
2.2.2 Tipos de suero	7
2.2.3 Composición del suero	7
2.2.4 Problemática actual	9
2.3 Bacterias ácido lácticas	10
2.3.1 Generalidades	10
2.3.2 Metabolismo	10
2.3.3 Tipo de ácido láctico formado	14
2.3.4 Características de <i>Lactobacillus casei</i> (<i>Lb. casei</i>)	14
2.3.5 Factores importantes en el crecimiento de <i>Lb. casei</i> y producción de ácido láctico	15
2.3.5.1 Macronutrientes (Carbono y Nitrógeno)	15

2.3.5.2	Micronutrientes	15
2.3.5.3	Inóculo inicial	16
2.3.5.4	Temperatura	17
2.3.5.5	pH	17
2.4	Procesos de fermentación	18
2.4.1	Generalidades	18
2.4.2	Tipos de fermentación	19
2.4.2.1	Proceso tipo lote	19
2.4.2.2	Proceso semicontinuo	19
2.4.2.3	Proceso continuo	20
2.4.2.4	Procesos acoplados a una unidad de membrana	20
2.5	Tecnología de membrana	20
2.5.1	Fundamentos	20
2.5.2	Definición de membrana	22
2.5.3	Materiales y estructuras de la membrana	23
2.5.4	Separación por medio de membranas	24
2.5.4.1	Ósmosis inversa (RO)	24
2.5.4.2	Nanofiltración (NF)	25
2.5.4.3	Ultrafiltración (UF)	26
2.5.4.4	Microfiltración (MF)	26
2.6	Modelación matemática de bioprocesos	27
2.6.1	Generalidades	27
2.6.2	Creación y resolución de un modelo matemático	28
2.6.3	Modelos cinéticos de crecimiento microbiano y formación de producto	29
2.6.4	Modelación matemática de producción de ácido láctico	30
3.	JUSTIFICACIÓN	34
4.	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo general	35

4.2 Objetivos específicos	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Material Biológico	36
5.1.1 Microorganismo	36
5.1.2 Medio de Cultivo	36
5.1.3 Preparación del inóculo	36
5.2 Métodos	37
5.2.1 Evaluación del nivel de inóculo y concentración de lactosa sobre el desarrollo de <i>Lb. casei</i>	37
5.2.2 Producción de ácido láctico en fermentaciones tipo lote	37
5.2.3 Evaluación del funcionamiento de membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico	38
5.2.3.1 Limpieza de las membranas	41
5.3 Técnicas Analíticas	41
5.3.1 Cuantificación de Ácido Láctico y Lactosa	41
5.3.2 Determinación de Biomasa	42
5.4 Desarrollo del modelo matemático	42
5.4.1 Estimación de parámetros	42
5.5 Diseño Experimental y Análisis Estadístico	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1 Evaluación del efecto de la concentración de sustrato inicial y el porcentaje de inóculo inicial en el crecimiento de <i>Lb. casei</i>	45
6.2 Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de suero lácteo	52
6.3 Efecto del control del pH en el crecimiento del microorganismo, formación de producto y en el consumo de sustrato	53
6.4 Análisis de los perfiles de formación de producto, biomasa y consumo en la condición de pH 6.0	61
6.5 Evaluación de la separación de ácido láctico por medio de membranas de nanofiltración	64
6.6 Desarrollo del modelo	71
6.6.1 Determinación de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S	71

6.6.2 Modelación matemática de la formación de biomasa, del producto y del consumo de sustrato	74
7. CONCLUSIONES	80
8. BIBLIOGRAFIA	81
ANEXO A	89
ANEXO B	91
ANEXO C	97

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición típica del suero dulce y ácido (Jelen, 2003).	8
2	Productividades de ácido láctico utilizando <i>Lb. casei</i> a partir de distintas concentraciones de sustrato y % de inóculo inicial.	16
3	Características de los diferentes tipos de separación por membranas	27
4	Cálculos de los parámetros de las ecuaciones de Altiok <i>et al.</i> (2006) y Tango y Ghaly (1999).	32
5	Especificaciones de membranas de nanofiltración utilizadas para la separación de ácido láctico.	40
6	Características de la producción de ácido láctico por <i>Lb. casei</i> a partir de suero lácteo en diferentes condiciones de pH después de 24 h de fermentación.	60
7	Valores estimados de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S mediante el ajuste no lineal realizado a partir de la ecuación 13.	71
8	Valores estimados de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S mediante el ajuste no lineal realizado a partir de la ecuación 14.	71
9	Parámetros cinéticos reportados en distintos trabajos.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Molécula de ácido láctico.	3
2	Molécula de lactosa.	8
3	Fermentación homoláctica (Larpent, 1995).	12
4	Fermentación láctica heterofermentativa (Larpent, 1995).	13
5	Diagrama básico de un sistema de separación por membranas.	22
6	Esquema del sistema experimental para la producción y separación de ácido láctico.	39
7	Unidad de membrana (SEPA CF II, Osmonics) utilizada para la separación de ácido láctico.	39
8	Cinética de Monod.	43
9	Cinéticas de crecimiento de <i>Lb. casei</i> en un medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado, con diferentes concentraciones de lactosa (20, 30, 40, 50 g/L) y con inóculos (v/v) del 1% (A), 5% (B), 10% (C) y 20% (D), agregados en fase de crecimiento estacionaria.	46
10	Cinéticas de crecimiento de <i>Lb. casei</i> en un medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado, con diferentes concentraciones de lactosa (20, 30, 40, 50 g/L) y con inóculos (v/v) del 1% (A), 5% (B), 10% (C) y 20% (D), agregados en fase de crecimiento exponencial.	47
11	Efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento microbiano.	48
12	Efecto de la interacción entre la fase de crecimiento microbiano (estacionaria y exponencial) y los porcentajes de inóculo sobre el crecimiento microbiano.	48
13	Log (UFC/ml) de crecimiento microbiano a las 20 h para los inóculos agregados en fase estacionaria en las diferentes concentraciones de sustrato.	49
14	Log (UFC/ml) de crecimiento microbiano a las 20 h para los inóculos agregados en fase exponencial en las diferentes concentraciones de sustrato.	50
15	Cinéticas de crecimiento de <i>Lb. casei</i> con una concentración de lactosa en suero lácteo de 50 g/L, para la condición de 1% de inóculo agregado en fase estacionaria y 1% de inóculo agregado en fase exponencial.	50
16	Producción de ácido láctico a través del tiempo a partir de las mejores condiciones obtenidas para el crecimiento del microorganismo.	53

17	Cinética de crecimiento de <i>Lb. casei</i> (A) y formación de biomasa durante el crecimiento del microorganismo (B) en la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote.	55
18	Producción de ácido láctico en la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote.	56
19	Concentración residual de sustrato mostrado a través del tiempo en la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote.	57
20	Perfil de la producción de ácido láctico, consumo de sustrato, formación de biomasa a un pH controlado de 6.0.	63
21	Efecto de la presión en la recuperación de lactosa.	67
22	Efecto de la presión en la recuperación de ácido láctico.	68
23	Efecto del tiempo en la recuperación de lactosa.	68
24	Efecto del tiempo en la recuperación de ácido láctico.	69
25	Efecto de la membrana en la separación de lactosa.	69
26	Efecto de la membrana en la separación de ácido láctico.	70
27	Efecto de la presión en el flujo del permeado.	70
28	Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod con las velocidades específicas obtenidas a partir de la ecuación 13.	72
29	Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod con las velocidades específicas obtenidas a partir de la ecuación 14.	72
30	Perfil de la formación de biomasa a través del tiempo para la condición de pH controlado a 6.0.	75
31	Perfil del consumo de sustrato a través del tiempo para la condición de pH controlado a 6.0.	76
32	Perfil de la producción de ácido láctico a través del tiempo para la condición de pH controlado a 6.0.	76
33	Ajuste lineal de los datos experimentales relativos a la formación de biomasa.	77
34	Ajuste polinomial de los datos experimentales para la formación de ácido láctico con respecto a la biomasa.	78
35	Comportamiento tridimensional de la formación de biomasa y producto con respecto al consumo de sustrato.	79

1. INTRODUCCIÓN

A través de bioprocesos pueden obtenerse productos con un alto valor comercial, como lo es el ácido láctico, utilizado en la industria alimentaria como acidulante, conservador, saborizante y agente controlador de pH, también tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, textil, cosmética y en la producción de polímeros biodegradables (Datta y Henry, 2006; Liu *et al.*, 2010). En los últimos años ha habido diversas investigaciones en el desarrollo de procesos para la producción de ácido láctico con la finalidad de hacer posible un proceso más efectivo y económico.

La conversión biológica tiene un papel importante en el manejo de subproductos industriales provenientes de procesos alimentarios ya que estos subproductos contienen sustratos aprovechables para la generación de productos con valor agregado (Rojan *et al.*, 2007). La disposición de las grandes cantidades de suero lácteo generado por las industrias queseras en todo el mundo representa un problema debido a que el suero lácteo no debe ser drenado sin ningún tratamiento debido a la gran cantidad de materia orgánica que contiene, en la que destaca la lactosa, que es un sustrato altamente fermentable por los microorganismos para la producción de ácido láctico (Ghaly y Kamal, 2004; Schepers *et al.*, 2006). El ácido láctico puede ser obtenido a partir de la fermentación del suero lácteo por bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus casei* y el proceso puede ser realizado en fermentaciones tipo lote.

En la actualidad se están buscando nuevas formas de separar el ácido láctico del caldo de fermentación una vez terminada la etapa de fermentación. Una aplicación novedosa, es el uso de un módulo de membrana, por medio del cual es posible separar el ácido láctico. La tecnología de membranas ha mostrado sus ventajas en los campos de la separación y filtración y recientemente ha habido un mayor interés hacia la separación de los procesos de membrana porque son más eficientes en cuanto a capital y a costos cuando son comparados con los procesos tradicionales de separación.

Por otro lado, la modelación matemática de procesos biológicos es una herramienta que resulta muy útil para realizar predicciones sobre el comportamiento de un sistema determinado y en la optimización del mismo. La producción de ácido láctico puede ser modelada a partir de tres variables importantes que describen el proceso, concentración de biomasa, sustrato y formación del producto.

Por lo que se pretende caracterizar el proceso de obtención de ácido láctico por fermentación a partir del suero lácteo utilizando *Lb. casei* como microorganismo y la separación del ácido láctico formado a través de la tecnología de membranas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Ácido Láctico

2.1.1 Generalidades

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico (Figura 1), fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y en 1881 Littlelon inicia la fermentación a escala industrial (Tong *et al.*, 2004; Serna y Rodríguez, 2005).

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico lo cual da lugar a la actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D(-) láctico y L(+) láctico y 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 cuerpo humano (Liu *et al.*, 2010). Tanto las dos formas ópticamente activas como la forma racémica se encuentran en estado líquido, siendo incoloros y solubles en agua. En estado puro son sólidos altamente higroscópicos de punto de fusión bajo, el cual es difícil de determinar debido a la extrema dificultad de producirlo anhidro; es por esto que se maneja el intervalo de 18-33°C. El punto de ebullición del producto anhidro está entre 125-140°C (Serna y Rodríguez, 2005).

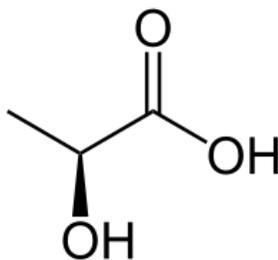


Figura 1. Molécula de ácido láctico.

2.1.2 Usos

El ácido láctico es comúnmente reconocido como uno de los ácidos orgánicos más versátiles por un amplio uso en la industria farmacéutica, alimentaria y en la química (Diosady y Puzanov 2005; Li *et al.*, 2009). Tradicionalmente, el principal uso del ácido láctico ha sido en aplicaciones alimentarias, lo cual en Estados Unidos representa el 85% del total de la demanda, y el resto es usado en aplicaciones no alimentarias. Como acidulante para alimentos, el ácido láctico tiene un sabor ácido suave, en contraste con otros ácidos. Es no volátil y no tiene olor y es clasificado como GRAS para propósitos generales de aditivos alimentarios por la FDA en Estados Unidos y por otras agencias reguladoras de otros países. Es un buen agente conservador para vegetales. Es usado como acidulante, saborizante, agente controlador de pH o como inhibidor de crecimiento microbiano en una amplia variedad de productos procesados. Un alto porcentaje (>50%) del ácido láctico usado en alimentos se usa para producir agentes emulsificantes usados particularmente en la industria del pan. Los agentes emulsificantes son ésteres de sales de lactato con largas cadenas de ácidos grasos (Datta y Henry, 2006; Rojan *et al.*, 2009).

Recientemente, ha habido un incremento interesante en la producción de ácido láctico, dado que puede ser usado como materia prima para la producción de ácido poliláctico, un polímero usado como un plástico biodegradable (Xu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2010).

Algunos ejemplos de productos derivados del ácido láctico que han tenido una gran demanda en los últimos años, son: termoplásticos biodegradables (ácido poliláctico), solventes verdes (etil, propil, butil) y químicos oxigenados (glicol de propileno). Por la presencia única de un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico, el ácido láctico puede participar 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 todo un rango de

productos que tienen grandes usos en la producción industrial (Pal *et al.*, 2009; Young-Jung y Ryu, 2009).

2.1.3 Procesos de Producción

El ácido láctico puede ser producido por síntesis química y por bioprocesos (González *et al.*, 2008). Por síntesis química se obtiene haciendo reaccionar ácido cianhídrico con acetaldehído en fase líquida en presencia de un catalizador y altas presiones para formar un lactonitrilo. El lactonitrilo crudo se purifica después por destilación y por medio de una hidrólisis subsecuente se forma ácido láctico. Este proceso es costoso debido a que el petróleo, la base de la materia prima es el principal contribuyente del alto costo. Además las rutas de síntesis química producen una mezcla de L-ácido láctico y D-ácido láctico mientras que en la mayoría de los casos el L-ácido láctico es el producto deseado. Los problemas de alto costo de materia prima, la impureza del producto y la dependencia de otras industrias para la obtención de materia prima pueden ser superados por los procesos basados en fermentaciones (Narayanan *et al.*, 2004; Fontes *et al.*, 2010).

La producción de ácido láctico a partir de bioprocesos se realiza por fermentación y se puede producir a partir de diferentes sustratos y microorganismos, dando como resultado un ácido ópticamente activo (Milcent y Carrere, 2001). La obtención de ácido láctico con enzimas o microorganismos vivos pueden producir isómeros dextrógiros, levógiros o una mezcla racémica, dependiendo del microorganismo involucrado en el proceso, siendo de mayor interés el isómero (L) porque puede ser asimilado por el organismo y la mezcla racémica, la cual se emplea para la elaboración de polímeros así como para uso industrial (Urribarí *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005; Litchfield, 2009).

El proceso de producción de ácido láctico por medio de bioprocesos incluye dos etapas, la primera es una fermentación seguida de la recuperación del producto (Shahbazi, *et al.*, 2005). El cambio más grande en la producción de ácido

láctico se encuentra en el paso de recuperación y no en la fermentación. Se han aplicado varias estrategias y combinaciones para la recuperación del ácido láctico del caldo de fermentación. La neutralización con una base seguida por filtración, concentración y acidificación es el proceso tradicional para la recuperación de ácido láctico, este proceso genera sales de calcio como producto, causando altos costos químicos y generación de residuos (Sun *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2009).

Otras alternativas en los procesos de recuperación de ácido láctico han sido estudiadas como la extracción con solventes, adsorción, destilación directa y electrodiálisis (Tong *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006). La extracción con solventes es limitada por los problemas ambientales que causan los solventes empleados. Los procesos de adsorción requieren regeneración de las resinas de intercambio iónico, además presentan desventajas como el corto tiempo de vida de los adsorbentes, baja capacidad, y filtración adicional. La destilación directa es un proceso con altos requerimientos de energía, y puede ocasionar la transformación del producto como la polimerización del ácido láctico (González *et al.*, 2007, Pal *et al.*, 2009).

Recientemente se ha estudiado la separación y filtración de ácido láctico usando la tecnología de membranas debido a que presenta varias ventajas sobre muchas de las técnicas tradicionales de separación tales como destilación, extracción, intercambio iónico y adsorción. No requiere solventes costosos o adsorbentes y es posible la separación y concentración tanto de compuestos inorgánicos y orgánicos simultáneamente (Li *et al.*, 2007).

2.1.4 Producción Mundial

En la actualidad se estima que la producción mundial de ácido láctico (incluyendo los usos para polímeros) es alrededor de 120 000 toneladas por año, mientras que en 1990 esta cifra era de tan sólo 40 000 toneladas por año aproximadamente. De esta forma en la última década, la producción de ácido láctico ha crecido considerablemente, principalmente debido al desarrollo de

nuevos usos y la tecnología de producción es basada principalmente en la fermentación de carbohidratos. Las principales empresas manufactureras de ácido láctico en el mundo incluyen a CCA Biochemical BV con plantas en Europa, Brasil y Estados Unidos, Archer Daniels Midland (ADM) y NatureWorks LLC en Estados Unidos, Musahino Chemical en Japón, Purac (Holanda), Galactic (Bélgica) y varias compañías chinas (Datta y Henry, 2006; Rojan *et al.*, 2007).

2.2 Suero lácteo

2.2.1 Definición

El suero lácteo puede ser definido como el suero o la parte acuosa de la leche que queda después de la separación de la cuajada, la cual resulta de la coagulación de la caseína (proteína de la leche) usando la enzima quimosina. La coagulación inducida por quimosina ocurre aproximadamente a pH de 6.5 (Panesar *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010).

2.2.2 Tipos de suero

Existen dos tipos principales de suero de acuerdo al procedimiento usado para la precipitación de la caseína. El primer tipo de suero es conocido como suero dulce (pH 6-7) resulta de la producción de quesos frescos o suaves tales como el queso crema y queso cottage. El segundo tipo de suero, es el suero ácido (pH<5) que resulta de la fermentación por cultivos iniciadores o de la adición de ácidos orgánicos o minerales para coagular la caseína en la elaboración de quesos madurados (Jelen, 2003; Guimarães *et al.*, 2010; Tabla 1).

2.2.3 Composición del suero

El principal componente de los sueros dulces y ácidos, después del agua, es la lactosa (aproximadamente 70-72% del total de sólidos), también está compuesto por las proteínas de suero (aproximadamente 8-10%) y de minerales (aproximadamente 12-15%) (Jelen, 2003; Cuadro 1). El suero también contiene cantidades apreciables de otros componentes, como lo son, ácido láctico y cítrico

(0.05% w/v) compuestos nitrogenados no proteicos (urea y ácido úrico) y vitaminas del grupo B. Las mayores diferencias entre los dos tipos de suero son el contenido mineral y la acidez. (Panesar *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Composición típica del suero dulce y ácido (Jelen, 2003).

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

La lactosa o β -D-galactopiranosil-(1,4)-glucopiranososa (Figura 2) es el principal carbohidrato de la leche, es un disacárido compuesto por la D-glucosa y D-galactosa. El grupo aldehído de la galactosa está unido a C-4 de la glucosa por medio de un enlace β -1,4-glicosídico. Puede ser separada de la leche o en la práctica industrial del suero permitiendo su cristalización. La lactosa cristalizada es producida en grandes cantidades y es principalmente usada en alimentos y farmacéuticos. La lactosa es también usada como materia prima para una diversidad de derivados químicos o enzimáticos (Walstra *et al.*, 2006).

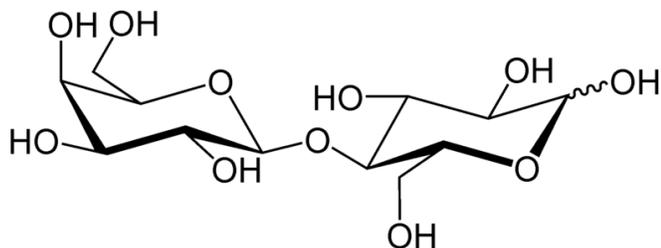


Figura 2. Molécula de lactosa.

2.2.4 Problemática actual

La industria quesera genera una cantidad significativa de suero lácteo, cuya disposición requiere grandes cantidades de aportación de capital. Aproximadamente 85% del total de la leche usada para la manufactura del queso es desechada como suero (Panesar *et al.*, 2007). En México se reportó una producción de queso en 2008 de 149, 888 ton, lo que significa una generación estimada de 1, 348, 992 ton de suero lácteo (SIAP, 2008). Además sólo el 10% del suero generado es recuperado y usado, principalmente para aplicaciones de un valor bajo como la alimentación animal (Álvarez *et al.*, 2010).

La disposición del suero lácteo ha sido un problema para la industria quesera. La mayoría de los medianos y pequeños productores todavía disponen de su suero directamente en tierras de cultivo lo cual presenta un riesgo ambiental (Li *et al.*, 2008). La mayoría de las plantas de leche no tienen sistemas de tratamiento adecuados para la disposición del suero y la descarga del suero constituye una pérdida significativa de su potencial alimenticio y energético porque el suero retiene el 55% del total de los nutrientes de la leche. Así, su disposición genera serios problemas de contaminación para el ambiente circundante, debido a que afecta la estructura física y química de la tierra, resultando en una disminución del rendimiento de cultivos y cuando es descargado dentro de cuerpos de agua, reduce la vida acuática por agotamiento del oxígeno disuelto (González-Siso, 1996). De esta manera, el suero presenta una gran amenaza para el medio ambiente y para la salud humana, por lo que es necesario proponer soluciones efectivas y permanentes a esta problemática. A través de los años se han buscado maneras para transformar las grandes cantidades de suero generado como subproducto de la industria quesera en productos para el uso en alimentos (Pescuma *et al.*, 2010). Una alternativa es emplear el suero como materia prima para generar productos mediante procesos biotecnológicos. La disponibilidad de lactosa como reserva de carbohidratos en el suero y la presencia de otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos hacen del suero una

materia prima particularmente importante para su utilización como sustrato (Polom y Szaniawska, 2006; Aguirre-Ezkauriatza *et al.*, 2009).

2.3 Bacterias ácido lácticas

2.3.1 Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no formadoras de esporas, catalasa negativa, en forma de cocos o bastones, con un metabolismo estrictamente fermentativo en el que se produce ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares (Axelsson, 2004). Las BAL comprenden principalmente los siguientes géneros, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. *Lactobacillus* es por mucho el género predominante de las BAL, y actualmente son reconocidos más de 125 nombres de especies y subespecies (Axelsson, 2004; Panesar *et al.*, 2007).

2.3.2 Metabolismo

La principal característica del metabolismo de las BAL es la fermentación eficiente de carbohidratos junto con la fosforilación a nivel sustrato. Básicamente hay dos rutas principales para la fermentación de hexosas en las bacterias ácido lácticas: la fermentación homoláctica y la fermentación heteroláctica (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal 2000; Nousiainen *et al.*, 2004; Figuras 3 y 4).

El primer paso en el metabolismo de la lactosa es su transporte al interior de la célula. Hay dos sistemas principales usados por las BAL para transportar la lactosa a través de la membrana de la célula. Uno es el mecanismo de traslocación, en el cual la lactosa es fosforilada durante el paso a través de la membrana citoplasmática. La fuente inicial de fosfato es la energía del intermediario de la glucólisis fosfoenol piruvato (PEP), y el mecanismo es llamado sistema de la fosfotransferasa fosfoenol piruvato (PEP-PTS). Cuatro proteínas están involucradas en este sistema. Primero, la enzima II (EII), es una proteína de

la membrana citoplasmática, donde es fosforilada por una proteína específica de azúcar, la enzima III (EIII), la cual se encuentra en el citoplasma. Hay otras dos proteínas, la enzima I (EI) y la FPr (proteína que contiene histidina), que son proteínas citoplasmáticas no específicas y están involucradas en la transferencia de un residuo de fosfato de la PEP a la EIII. Como consecuencia de estas reacciones, la fosfato-lactosa se acumula intracelularmente a un costo neto de fosfato rico en energía. La fosfato-lactosa es hidrolizada a glucosa y galactosa-6-fosfato por la fosfo- β -galactosidasa (P- β -gal). La glucosa es convertida a glucosa-6-fosfato, y ambos azúcares fosfatados son metabolizados posteriormente (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Walstra *et al.*, 2006).

El segundo sistema de transporte de lactosa hacia el interior de la célula de las bacterias ácido lácticas involucra proteínas citoplasmáticas (permeasas) que traslocan el azúcar a la célula sin modificaciones químicas. Situada en la membrana citoplasmática, la lactosa permeasa trasloca la lactosa junto con los protones hacia dentro del citoplasma. La lactosa permeasa es un sistema de transporte activo, y la energía es suministrada en la forma de un protón, motivo de la fuerza desarrollada por la ATPasa transmembrana a expensas de la hidrólisis de ATP (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004; Walstra *et al.*, 2006).

En la fermentación homoláctica (Figura 3) las especies de *Lactobacillus* metabolizan los azúcares por medio de la ruta glucolítica de Embden-Meyerhof, y el ácido láctico es sólo el producto final bajo condiciones típicas de fermentación. Un mol de lactosa es transformado en 4 moles de ácido láctico. Algunas especies fermentan sólo la glucosa, o sea la mitad de la lactosa por lo que galactosa la excretan de la molécula en proporción a la cantidad de lactosa tomada. En este caso el metabolismo de la lactosa produce sólo 2 moles de ácido láctico. En teoría, una molécula de glucosa, a través de la fermentación homoláctica, produce 2 moléculas de ácido láctico y una ganancia neta de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa (Limsowtin *et al.*, 2002; Axelsson, 2004).

Las especies de fermentación facultativa heteroláctica (Figura 4) metabolizan hexosas a través de la ruta glucolítica Embden-Meyerhof, pero las pentosas y algunas otras sustancias son metabolizadas por la ruta de la fosfoctolasa para producir ácido láctico y otros productos (típicamente etanol y CO_2). Las especies de fermentación heteroláctica obligatoria usan solamente la ruta de la fosfoctolasa para el metabolismo de azúcares, y además de ácido láctico, producen cantidades significantes de etanol con generación de dióxido de carbono. La fermentación heteroláctica de glucosa a través de de ruta de la fosfoctolasa genera 1 mol de cada uno de los siguientes compuestos: ácido láctico, etanol y CO_2 y 1 mol de ATP por molécula de glucosa consumida (Limsowtin *et al.*, 2002; Axelsson, 2004).

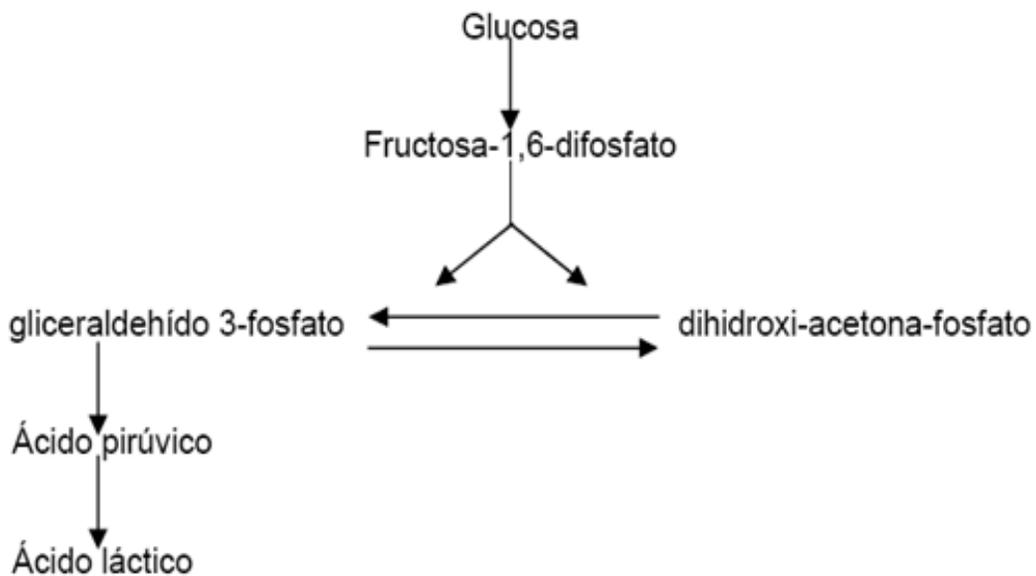


Figura 3. Fermentación homoláctica (Larpent, 1995).

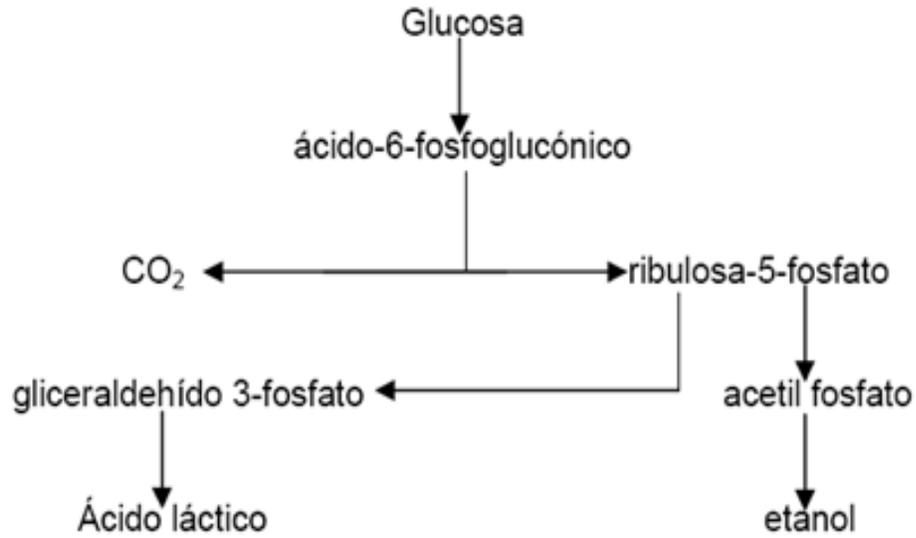


Figura 4. Fermentación láctica heterofermentativa (Larpent, 1995).

Otras hexosas diferentes a la glucosa, tales como manosa, galactosa y fructosa, son fermentadas por varias BAL. Los azúcares entran a la mayoría de las rutas al nivel de glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato después de la isomerización y/o fosforilación. Una excepción importante es el metabolismo de la galactosa en las BAL, la cual es metabolizada tanto a través de la ruta de la tagatosa 6-fosfato o por la vía de Leloir. Algunas BAL después del transporte de la lactosa dividida por la β -galactosidasa sólo metabolizan la glucosa, mientras que la galactosa es excretada al medio. Por otra parte especies como *Lc. lactis* y *Lb. casei* metabolizan la galactosa-6-fosfato por medio de la ruta de la tagatosa-6-fosfato. La tagatosa es un isómero de la fructosa, pero se requieren enzimas adicionales para el metabolismo de los derivados de la tagatosa. La ruta de la tagatosa coincide con la glucólisis a nivel del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) (Axelsson, 2004; Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 2004).

2.3.3 Tipo de ácido láctico formado

La configuración de ácido láctico es muy importante desde el punto de vista nutricional. Niveles elevados del isómero D-ácido láctico son tóxicos para los humanos, por esta razón se prefiere el L-ácido láctico en el industria de alimentos y farmacéutica (Jin *et al.*, 2005). Una ingesta dietética más alta de D-ácido láctico o DL-ácido láctico puede resultar en una elevación del nivel de D-ácido láctico en la sangre, y puede ocurrir una hiperacidez de la orina. Estos resultados causaron que la WHO (Organización Mundial de la Salud) limitara el consumo humano de D- ácido láctico a 100 mg/ [kg • día] (Panesar *et al.*, 2007).

Durante la fermentación de azúcares, diferentes especies de bacterias ácido lácticas producen tanto L-ácido láctico como D-ácido láctico. Esto depende de la presencia específica de NAD⁺ dependiente de lactato deshidrogenasa (nLDH). Las bacterias ácido lácticas principalmente logran la regeneración de NAD⁺ por la reducción de piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa. El lactato puede existir como estereoisómero D o L, y las enzimas lactato deshidrogenasas específicas para cada isómero se encuentran en estas bacterias. Ciertas bacterias contienen ambas enzimas, las cuales producen una mezcla racémica (DL), mientras que otras producen solo D-ácido láctico o L-ácido láctico (Panesar *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

2.3.4 Características de *Lactobacillus casei* (*Lb. casei*)

Se trata de una bacteria mesófila, con morfología de bacilo; su metabolismo depende de la cepa, algunas presentan un metabolismo homofermentativo y otras son heterofermentativas facultativas. Es productora de ácido láctico que genera predominantemente la forma L(+), no metaboliza el citrato y no es capaz de producir diacetilo. Se emplea en la industria láctea en la elaboración de alimentos lácteos probióticos. Esta especie particular de lactobacilo se ha comprobado que es muy resistente a intervalos muy amplios de pH y temperatura (Walstra *et al.*, 2006).

2.3.5 Factores importantes en el crecimiento de *Lb. casei* y producción de ácido láctico

2.3.5.1 Macronutrientes (Carbono y Nitrógeno)

El contenido de nutrientes en el medio de cultivo es elemental en el crecimiento celular y por consiguiente en la concentración y productividad de ácido láctico logradas. Por lo general las bacterias necesitan algún tipo de compuesto orgánico como fuente de carbono, así como también una fuente de nitrógeno para su crecimiento. Una de las formas más común de suministrar la fuente de carbono en el medio de cultivo es por medio de los azúcares (Madigan *et al.*, 2004). Se han reportados estudios con relación al crecimiento de *Lb. casei* a partir de distintas concentraciones de sustrato iniciales (Cuadro 2). De la misma forma, la suplementación del medio de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno es uno de los factores clave en la fermentación (Mondragón-Parada *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). El alto costo del extracto de levadura limita su uso en las fermentaciones y la concentración de extracto de levadura en los procesos industriales es en la mayoría de los casos subóptima (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Con el fin de bajar costos de los procesos de producción se ha probado que algunas otras fuentes de nitrógeno pueden proporcionar el mismo efecto que el extracto de levadura, tales como la peptona, la malta y la yuca (Hujanen y Linko, 1996; Fontes *et al.*, 2010).

2.3.5.2 Micronutrientes

Aunque los micronutrientes se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes para el funcionamiento celular como los macronutrientes (carbono, nitrógeno). La mayoría de las veces los micronutrientes tienen un función estructural en varias enzimas (Madigan *et al.*, 2004).

Para el crecimiento de *Lb. casei* es esencial suplementar el medio de fermentación con $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. El ion Mn^{+2} es el ión que el *Lb. casei* necesita del $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ debido a que es un constituyente de la enzima lactato deshidrogenasa (Fitzpatrick *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Productividades de ácido láctico utilizando *Lb. casei* a partir de distintas concentraciones de sustrato y % de inóculo inicial.

Autores	Concentración de sustrato (g/L)	% Inóculo (v/v), Etapa de crecimiento	Productividad máxima de ácido láctico (g/L h)
Hujanen y Linko (1996)	70 g de glucosa	20%, Fase Exponencial	4.1
Büyükkileci y Harsa (2004)	48 g de lactosa	5%, Fase Estacionaria	1.7
Altiok <i>et al.</i> (2006)	35.5 g de lactosa	12.5%, Fase Estacionaria	2.5
Alonso <i>et al.</i> (2010)	21.5 g de lactosa, 18.1 g de glucosa, 19.0 g de sacarosa	10%, Fase Exponencial	0.76

2.3.5.3 Inóculo inicial

El crecimiento del inóculo es un paso importante en la producción de ácido láctico. Para iniciar el proceso de fermentación se puede utilizar el inóculo inicial tanto en una fase de crecimiento exponencial como en fase de crecimiento estacionaria. Algunos autores han utilizado el inóculo inicial en fase de crecimiento exponencial y otros en fase estacionaria (Cuadro 2). Las razones por las cuales usar una etapa u otra no han sido claramente definidas. En la literatura se ha reportado que si un cultivo en fase exponencial se inocula en un medio con las mismas condiciones de cultivo, el crecimiento se inicia inmediatamente y no se observa algún retraso, por otra parte si el inóculo inicial se toma de un cultivo en fase estacionaria y se inocula en un medio con las mismas características, se observa una etapa de adaptación en el crecimiento (Madigan *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados de algunos estudios no manifiestan lo anterior (Altiok *et al.*, 2006; Mussatto *et al.*, 2008). Además existe una falta de información publicada acerca de las condiciones del inóculo usadas en los procesos comerciales.

Además, el tamaño del inóculo, número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro es importante en la velocidad de crecimiento celular. Distintos autores han trabajado con diferentes cantidades iniciales de inóculo (Cuadro 2).

2.3.5.4 Temperatura

La mayoría de los *Lactobacillus* se encuentran en la categoría de mesófilos aunque la temperatura óptima de crecimiento varía de acuerdo al género de 20 a 45°C. Para el *Lb. casei* la producción más rápida de ácido láctico se obtiene a los 37°C, sin embargo, la velocidad de formación de producto es muy similar en el intervalo de temperaturas de 32°C-42°C, por lo que el efecto de la temperatura no es significativo en este intervalo. La formación del producto es bastante lenta a 27°C y la fermentación es completada en 45 horas a esta temperatura mientras que para el rango de 32°C-42°C la fermentación es realizada en 30 horas aproximadamente (Büyükkileci y Harsa, 2004).

2.3.5.5 pH

La concentración de iones hidrógeno es un parámetro importante que tiene un fuerte efecto en la producción de ácidos orgánicos formados durante procesos fermentativos debido a que cuando se acumulan en gran cantidad en el caldo de fermentación inhiben el crecimiento del microorganismo.

Para controlar el pH durante la fermentación, agentes neutralizantes tales como el carbonato de calcio, el carbonato de sodio y el hidróxido de sodio se deben agregar en el medio de fermentación. Entre estos agentes, el carbonato de calcio ha sido ampliamente usado en investigaciones a nivel matraz y a nivel biorreactor. El hidróxido de sodio así como el hidróxido de amonio también han sido usados en investigaciones previas (Zhang *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2010). Se ha mostrado que para una rápida y completa fermentación, el intervalo de pH óptimo para *Lb. casei* es 5.5-6.5. La fermentación es fuertemente inhibida a pH

bajo y cesa a valores de pH menor de 4.5. Sin embargo, la tolerancia ácida le da una ventaja competitiva sobre otras muchas bacterias (Büyükkileci y Harsa, 2004).

2.4 Procesos de fermentación

2.4.1 Generalidades

Los procesos de fermentación son una parte esencial de muchas industrias alimentarias, químicas y farmacéuticas, involucran la transformación de un sustrato determinado en productos mediante microorganismos, cultivos de células animales o vegetales y compuestos derivados de células como las enzimas. El término fermentación ha sido usado para referir el metabolismo de los azúcares por los microorganismos para la manufactura de productos específicos de interés. El uso de microorganismos para transformar materiales biológicos tiene sus orígenes en la antigüedad (Doran, 1995; McNeil y Harvey, 2008). Desde entonces, los procesos basados en fermentaciones han sido desarrollados para una enorme gama de productos, desde productos alimenticios como son el vino, la cerveza, yogurt, quesos, hasta productos químicos y farmacéuticos como ácidos orgánicos, antibióticos, proteínas, enzimas, vitaminas, vacunas, entre otros.

La generación de productos por fermentación dependen de varios factores como son: el microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, el tipo de fermentación empleado y la formación de subproductos (Hofvendahl y Hhan-Hägerdal, 2000). Las fermentaciones se llevan a cabo en un dispositivo llamado biorreactor, también denominado comúnmente fermentador, por medio del cual se proporciona un medio ambiente controlado que permite la obtención de productos de interés a partir de la transformación microbiológica o enzimática de un sustrato. El medio ambiente adecuado que proporciona un biorreactor, tiene que tener niveles óptimos de temperatura, pH, sustrato, sales, y oxígeno, para así convertir los sustratos en productos específicos (metabolitos en el caso de fermentación microbiana) de interés (Rodríguez *et al.*, 2003; Alford, 2006; Mattews, 2008). Las fermentaciones a nivel laboratorio pueden ser realizadas en matraces Erlenmeyer o cajas petri, los cuales se aplican tanto para transformación microbiana o

enzimática de un sustrato, son utilizados por su simplicidad y son convenientes cuando se trabaja con volúmenes pequeños (Ruíz-Leza *et al.*, 2007).

2.4.2 Tipos de fermentación

2.4.2.1 Proceso tipo lote

La fermentación en lote es el modo de operación más simple y se considera como un sistema cerrado, es usado frecuentemente en el laboratorio para obtener cantidades substanciales de células o productos para su análisis posterior (Macauley-Patrick y Finn, 2008). Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Rodríguez *et al.*, 2003). La fermentación en biorreactores de lote es un proceso de baja productividad si se presenta un efecto tóxico de los productos hacia los microorganismos (Moueddeb *et al.*, 1996).

2.4.2.2 Proceso semicontinuo

Un proceso semicontinuo es un cultivo en lote alimentado continuamente o consecuentemente con sustrato sin la remoción del caldo de fermentación, esto es especialmente benéfico cuando los cambios en la concentración de nutrientes afecta la productividad y biomasa en el producto deseado (Ding y Tan, 2006). Esta estrategia de alimentación permite que el microorganismo crezca a una velocidad de crecimiento específica deseada, minimizando la producción de subproductos no deseados y permitiendo que se logren altas densidades de células y concentraciones de producto. La adición del sustrato puede ser sobre un periodo corto o largo, empezando inmediatamente después de la inoculación o en un punto predeterminado durante la fermentación (Macauley-Patrick y Finn, 2008).

2.4.2.3 Proceso continuo

En la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de caldo de fermentación con los nutrientes y microorganismos, es retirada de forma continua. Si bien los procesos de fermentación continua no se utilizan de forma general en la industria, debido fundamentalmente al mayor nivel de experiencia que se tiene en el crecimiento de células en fermentación discontinua, el costo de producción de biomasa mediante cultivo continuo es potencialmente inferior al de cultivo discontinuo (Rodríguez *et al.*, 2003).

2.4.2.4 Procesos acoplados a una unidad de membrana

Un biorreactor de membrana está compuesto por dos partes, el reactor biológico y un módulo de membrana; esta configuración es muy interesante para reacciones donde la eliminación continua de metabolitos es necesaria para mantener una buena productividad (Moueddeb *et al.*, 1996). El módulo de membrana permite separar físicamente compuestos de interés que se encuentran presentes en el medio de fermentación, distintos tipos de membrana pueden ser empleadas dependiendo del compuesto de interés a separar y por su alta selectividad pueden asegurar altos niveles de separación y purificación, además pueden ser fácilmente integradas a los fermentadores convencionales por lo que permiten la producción y purificación simultánea en la misma unidad. Además las técnicas de separación por membranas permiten recircular a las células para lograr un proceso de fermentación más eficiente (Giorno *et al.*, 2002).

2.5 Tecnología de membrana

2.5.1 Fundamentos

Durante las últimas décadas, la tecnología de membranas ha atraído la atención debido a su singular principio de separación y por la eficiencia de su separación comparada con otras operaciones unitarias. Las principales ventajas de los procesos de membrana manejados con presión son la calidad de purificación en el permeado, la operación a temperaturas moderadas y la

posibilidad para ser combinando con otros procesos de separación. Además, la separación por membranas no requiere aditivos y utiliza menos consumo de energía comparada con otros procesos de separación (Saxena *et al.*, 2009; Benítez *et al.*, 2011).

La tecnología de membranas permite la concentración y separación de soluciones sin el uso de calor. El principio es bastante simple, la membrana actúa como un filtro muy específico que permite el paso de ciertos componentes, mientras que retiene otros. Las partículas son separadas en base a su forma y tamaño molecular con el uso de la presión (Böddeker, 2008).

Las definiciones que son usadas frecuentemente como expresiones en la tecnología de membranas son (Sastre *et al.*, 2009):

- ✓ **Alimentación:** Es la solución a ser concentrada o separada.
- ✓ **Flujo:** La velocidad de extracción del permeado medido en litros por metro cuadrado de superficie de membrana por hora (L/ [m²•h]).
- ✓ **Ensuciamiento de membrana:** Es el depósito de sólidos en la membrana, irreversible durante el proceso.
- ✓ **Permeado:** Es el filtrado, el líquido que pasa a través de la membrana.
- ✓ **Retenido:** Es el concentrado, el líquido retenido.
- ✓ **Factor de concentración:** Es la reducción de volumen logrado por la concentración, por ejemplo el ratio del volumen inicial de alimentación al volumen final del concentrado.

En años recientes las técnicas de separación por membrana han evolucionado de ser una herramienta de un laboratorio a aplicaciones en procesos industriales teniendo un considerable impacto técnico y comercial (Sastre *et al.*, 2009). Actualmente las membranas son usadas en una amplia gama en aplicaciones tales como, purificación, diafiltración, desalinización, remoción y fraccionamiento de partículas, esterilización de fluidos, clarificación de fluidos, entre otras varias aplicaciones (Balley *et al.*, 2002).

Algunos requerimientos básicos para las membranas son: alto flujo del producto, una fuerza mecánica buena para soportar la estructura física y una selectividad adecuada para las sustancias que se desean separar. Generalmente, la alta selectividad está relacionada con las propiedades de la membrana, tales como el tamaño del poro o permeabilidad. La permeabilidad incrementa cuando incrementa la densidad de los poros, y la resistencia de la membrana es directamente proporcional a su grosor. Además, una buena membrana debe de tener un estrecho rango del tamaño del poro y una alta porosidad (Chen *et al.*, 2009).

Un sistema de separación por membrana separa el flujo que entra en dos efluentes: el permeado y el retenido o el concentrado, como se muestra en la Figura 5. El permeado es la porción del fluido que ha pasado a través de la membrana. El retenido (concentrado) contiene los componentes que han sido rechazados por la membrana (Chen *et al.*, 2009).

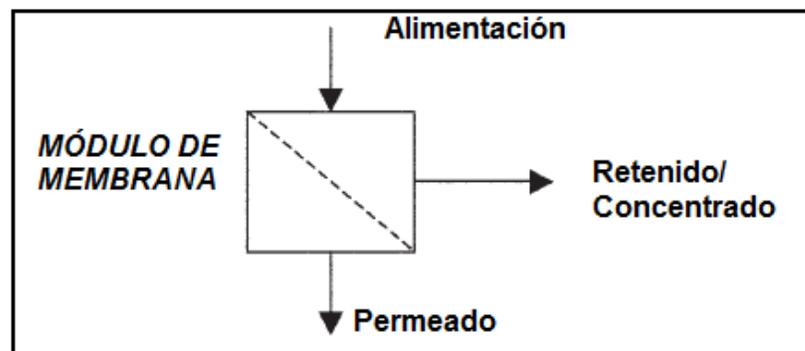


Figura 5. Diagrama básico de un sistema de separación por membranas.

2.5.2 Definición de membrana

Una membrana es esencialmente una barrera que separa en dos fases y restringe el transporte de varias especies químicas o bioquímicas de una manera selectiva. Es una capa delgada que puede separar materiales dependiendo de sus propiedades físicas y químicas cuando se aplica una fuerza a través de la membrana como un gradiente de potencial químico (gradiente de concentración o

presión) o un potencial eléctrico (Chen *et al.*, 2009). Su espesor puede variar entre menos de 100 nm a más de 1 cm. La resistencia eléctrica puede variar de varios megaohms ($M\Omega$) a una fracción de un Ω (Sastre *et al.*, 2009).

Las membranas usadas para procesos de separación pueden ser seleccionadas en base a su tamaño y forma, propiedades químicas, o a cargas eléctricas del material a ser separado. El material de la membrana deber ser seleccionado en base a su estabilidad química y física bajo las condiciones de operación, deben tener la permeabilidad requerida para el proceso dado y una forma de membrana conveniente (Lee y Koros, 2004).

2.5.3 Materiales y estructuras de la membrana

De acuerdo a su composición las membranas pueden ser orgánicas (poliméricas) o inorgánicas (cerámica). La mayoría de las membranas comerciales orgánicas son hechas de una amplia variedad de polímeros orgánicos, por ejemplo de celulosa y sus derivados (principalmente acetato de celulosa), polisulfones, poliamidas, hidrocarburos sustituidos de cloro y flúor. Las membranas inorgánicas están basadas en óxidos de zirconio, titanio, silicio y aluminio. Así también, las membranas pueden ser densas o porosas. La separación por membranas densas se basa en interacciones fisicoquímicas entre los componentes permeados y el material de la membrana. Las membranas porosas, por otro lado, logran la separación por la exclusión de tamaño, donde el material rechazado podría ser disuelto o suspendido dependiendo de su tamaño con relación al del poro (Berk, 2009; Chen *et al.*, 2009).

El material de la membrana debe ser químicamente inerte al material a ser procesado. La adsorción por la membrana concierne, porque puede provocar un cambio no deseado en la composición de la alimentación y reducir la vida útil de la membrana (Berk, 2009).

Las membranas más ampliamente usadas son las membranas asimétricas, estas membranas están compuestas de dos o más capas, cada una de ellas es de diferente estructura o composición y cada capa proporciona una

característica diferente. Una membrana asimétrica típica consiste de un capa muy delgada de material denso en la parte superior de un soporte macroporoso. La capa delgada, de sólo unas μm de grosor, contribuye a la retención requerida, mientras que el soporte provee una fuerza mecánica adecuada sin agregar mucha resistencia al flujo de permeado. En algunas membranas, la capa delgada (cubierta) y la capa porosa de abajo están fabricadas del mismo material de polímero (por ejemplo acetato de celulosa). En otras, es más apropiado el término “membranas compuestas”, porque sus capas consisten de diferentes polímeros (por ejemplo, capa delgada de poliamida sobre una capa abierta hecha de polisulfona en un respaldo altamente poroso). El material de la membrana debe ser químicamente inerte al material a ser procesado. La adsorción por la membrana concierne porque puede resultar en un cambio no deseado en la composición de la alimentación y en un acortamiento de la vida útil de la membrana (Berk, 2009).

2.5.4 Separación por medio de membranas

La clasificación por tamaño del poro está dada con valores de micras e indica que las partículas más grandes al tamaño pueden ser retenidas por la membrana. Por otra parte el peso molecular de corte (MWCO) indica que la mayoría de los solutos (aproximadamente 90%) con pesos moleculares más altos que el MWCO serán retenidos por la membrana. La forma de los componentes y su interacción en la solución afectan su retención. Las diferentes membranas manufacturadas usan distintos criterios para asignar la clasificación de MWCO a la familia de membranas (Walstra *et al.*, 2006). El principio de la tecnología de membranas está asociado a los diferentes procesos que a continuación se detallan. El Cuadro 3 muestra de forma resumida las características de cada proceso de membrana.

2.5.4.1 Ósmosis inversa (RO)

Las membranas de ósmosis inversa tiene el tamaño de poro más pequeño, con un diámetro que va de 0.5 a 1.5 nm, separan partículas que tienen un peso de 150-250 Da con MWCOs de 1 kDa o menores y requiere la aplicación

de altas presiones de 100-1500 psig. El tamaño extremadamente pequeño sólo permite que las moléculas orgánicas más pequeñas y solutos sin carga pasen a través de la membrana semipermeable junto con el agua. La mayor ventaja de la ósmosis inversa es la capacidad para concentrar soluciones diluidas para la recuperación de sales. Uno de los usos más comunes para la ósmosis inversa es en la purificación de agua para la remoción de sales y otras impurezas, con el objetivo de mejorar el color, el sabor o propiedades del fluido (Walstra *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009).

2.5.4.2 Nanofiltración (NF)

Es una técnica de separación que se encuentra entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa con un peso molecular de corte (MWCO) entre 200-2000 Da; su tamaño promedio de poro es de 1nm y trabaja con presiones que van desde 100 a 500 psig (Lee y Koros, 2004; Wang *et al.*, 2009). La nanofiltración no es tan fina como la ósmosis inversa, pero no requiere la misma energía para lograr la separación. Los procesos de separación por membranas de nanofiltración se introdujeron en las aplicaciones industriales como una alternativa factible de los procesos tradicionales de separación tales como: extracción, evaporación y destilación que se aplican al final de los procesos de tratamiento, acompañados por otras técnicas de separación (He *et al.*, 2009) y actualmente se usan en un amplio rango de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y en el tratamiento de agua potable.

Entre las aplicaciones de este proceso de membrana se pueden mencionar la obtención de ácidos orgánicos (ácidos acético, láctico, glucónico) producidos principalmente por fermentación. Estas fermentaciones generan un caldo que contiene la forma disociada del ácido (sales de sodio, amonio o calcio) y diferentes impurezas, tales como residuos de azúcar y sales minerales. Se requieren operaciones de purificación, concentración y conversión para obtener el ácido en la forma apropiada. La integración de la nanofiltración en el proceso puede ser investigada en diferentes etapas dependiendo del ácido orgánico. Por un lado para ácidos orgánicos de un peso molecular alto, la nanofiltración puede

ser considerada con un paso de concentración. Por otra parte puede constituir un paso de purificación en el caso de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Se ha mostrado, por ejemplo, que la nanofiltración es un método apropiado para el procesamiento del caldo de fermentación del acetato de sodio debido a su capacidad para permitir el paso del acetato mientras se retienen los nutrientes, como la glucosa, que pueden ser recirculados al caldo de fermentación (Bouchoux *et al.*, 2005).

2.5.4.3 Ultrafiltración (UF)

Las membranas de ultrafiltración tienen en promedio un tamaño de poro mucho menor que las membranas de microfiltración, son capaces de retener componentes en el rango de 1-1000kDa de peso molecular, con tamaños de poros de 0.001-0.1 μ m y operan entre 10 y 100 psig de presión. Las especies de rechazo típicas incluyen azúcares, biomoléculas, polímeros y partículas coloidales (Chen *et al.*, 2009). Una aplicación típica de las membranas de ultrafiltración es la filtración de macromoléculas disueltas de una solución como sucede en la concentración de proteínas del suero lácteo. Dependiendo del tipo de proteína a retener, son usados MWCO de la membrana en el rango de 1kDa a 1000kDa. Con la ultrafiltración es posible llevar a cabo separaciones de proteína-proteína basadas en el tamaño y la carga, resultando una purificación similar a la cromatografía (Walstra *et al.*, 2006).

2.5.4.4 Microfiltración (MF)

Las membranas de microfiltración tienen el tamaño de poro más grande de la categoría de membranas. Las aplicaciones más comunes son la remoción de células microbianas y la separación de macromoléculas. La microfiltración puede separar células microbianas para su subsecuente recirculación a un biorreactor para asegurar la alta concentración de células y de esta manera lograr una productividad alta. El tamaño de poro de la membrana usado para este tipo de separación se encuentra normalmente en el rango de 0.1-5.0 μ m y utiliza presiones entre 10-25 psig. (Lee y Koros, 2004; Pal, *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Características de los diferentes tipos de separación por membranas

Tipo de membrana	Tamaño promedio de poro	Presión (psig)	Aplicaciones
Ósmosis Inversa	0.5-1nm	100-1500	Remoción de sales, iones metálicos
Nanofiltración	1 nm	100-500	Recuperación de ácidos orgánicos, azúcares
Ultrafiltración	0.001-0.1µm	10-100	Separación de macromoléculas, tales como proteínas
Microfiltración	0.1-5.0 µm	10-25	Separación de células microbianas, tratamiento de agua residual

2.6 Modelación matemática de bioprocesos

2.6.1 Generalidades

La modelación matemática es el proceso de crear una representación abstracta de un fenómeno con el fin de obtener una mejor comprensión del mismo; es un paso esencial en el desarrollo de un proceso para predecir el comportamiento del sistema. El objetivo, por supuesto, no es producir una copia exacta del fenómeno real sino proporcionar una representación de algún aspecto relevante. Los modelos matemáticos son usados principalmente para definir fundamentos de procesos biológicos, químicos o físicos, para planear las condiciones experimentales y para evaluar los resultados experimentales (Altiok *et al.*, 2006; Blanchard *et al.*, 2006).

Los modelos matemáticos de sistemas se estudian en muchos casos con respecto al tiempo, pero con frecuencia dependen también de otras variables. Una vez construido el modelo matemático, se deben comparar las predicciones hechas por el modelo con los datos del sistema real. Si el modelo y el sistema concuerdan, significa que las suposiciones hechas en la creación del sistema son razonables y se puede usar el modelo para realizar predicciones. Sin embargo, si

el modelo y el sistema no concuerdan, se deben estudiar y mejorar las suposiciones del modelo (Blanchard *et al.*, 2006).

2.6.2 Creación y resolución de un modelo matemático

En la creación de un modelo matemático primero se deben establecer claramente las suposiciones en las cuales estará basado el modelo. Estas suposiciones deben describir la relación entre las variables a ser estudiadas. Se describe cómo trabaja el sistema físico, o al menos cuáles son los aspectos más importantes. Enseguida se definen operacionalmente las variables y los parámetros a ser usados en el modelo. Existen variables dependientes y variables independientes. La variable independiente más común es el tiempo. Por otra parte las variables dependientes son cantidades que están en función de las variables independientes y los parámetros son cantidades que no cambian con el tiempo.

La mayoría de los modelos dinámicos son expresados en ecuaciones diferenciales, en otras palabras, se expresan mediante las derivadas de las variables dependientes respecto al tiempo. Se usan las suposiciones usadas en el primer paso para derivar ecuaciones relacionando las variables y parámetros. Los sistemas de ecuaciones diferenciales involucran más de una variable dependiente (Blanchard *et al.*, 2006). Un proceso biológico, como el proceso de fermentación es un ejemplo de un fenómeno dinámico que puede ser descrito por un sistema de ecuaciones diferenciales y abordado como un sistema dinámico, debido a que el proceso de fermentación involucra distintas variables como son: la concentración de microorganismo (biomasa), formación de producto, concentración de sustrato, la temperatura, que cambian en función del tiempo.

Existen diferentes maneras para resolver ecuaciones diferenciales, una de los más comunes es mediante los métodos numéricos. Los métodos numéricos proporcionan información cuantitativa y gráfica acerca de la solución aunque no se pueda encontrar una fórmula. También tienen la ventaja de que la mayor parte del trabajo puede ser realizado por una computadora. La desventaja es que se obtienen sólo aproximaciones de la solución, no precisamente fórmulas. Si se está

consciente de este hecho, los métodos numéricos se convierten en herramientas poderosas para el estudio de ecuaciones diferenciales (Blanchard *et al.*, 2006).

2.6.3 Modelos cinéticos de crecimiento microbiano y formación de producto

Una ecuación ampliamente usada para describir una cinética de crecimiento microbiano es la ecuación de Monod (1), la cual relaciona la velocidad de crecimiento específico del microorganismo (μ) con la concentración de sustrato (S), donde $\mu_{m\acute{a}x}$ es la máxima velocidad de crecimiento alcanzable cuando la concentración del nutriente limitante no es limitante; K_s es conocida como la constante de Monod, la cual es la concentración del nutriente limitante de crecimiento a la cual la velocidad específica de crecimiento tiene la mitad de su valor máximo.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_s+S} \quad (1)$$

Bajo condiciones de crecimiento óptimas y cuando los efectos inhibitorios de sustrato y producto no se presentan, la velocidad de crecimiento celular sigue la bien conocida relación exponencial:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_s+S} X \quad (2)$$

La ecuación 2 implica que X (concentración de biomasa) incrementa con el tiempo independientemente de la disponibilidad de sustrato. En realidad, el crecimiento celular es gobernado por una relación hiperbólica y hay un límite para alcanzar la máxima concentración celular. Para describir tal crecimiento con ambas fases exponencial y estacionara, se introduce una ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right) \quad (3)$$

en donde $X_{m\acute{a}x}$ es la concentración de biomasa máxima, arriba de la cual la bacteria no crece. Además, otras formas de la ecuación de Monod pueden ser utilizadas para tomar en cuenta otros efectos de inhibición, por ejemplo, para el efecto de inhibición por producto, Levenspiel propuso la siguiente generalización

simple de la ecuación de Monod (4), en donde $P_{\text{máx}}$ es la concentración de producto máxima arriba de la cual la bacteria no crece y h es el poder tóxico (Altiok *et al.*, 2006).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^h \quad (4)$$

Para describir la formación de producto se usa comúnmente la ecuación de Luedeking-Piret (5) debido a que la producción de ácidos orgánicos puede estar asociada tanto a la fase crecimiento exponencial como a la fase estacionaria, donde α es el coeficiente asociado a la fase crecimiento exponencial y β es el coeficiente asociado a la fase de crecimiento estacionaria. De este modo la formación de producto depende de la concentración de biomasa X y de la velocidad de crecimiento dX/dt de una manera lineal.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (5)$$

2.6.4 Modelación matemática de producción de ácido láctico

Con relación a la producción de ácido láctico, se han usado modelos matemáticos para predecir la influencia de los parámetros de operación de la fermentación en la velocidad de crecimiento celular, en la concentración de células, en la velocidad de utilización de sustrato y velocidad de producción de ácido láctico; dichos modelos pueden tomar en cuenta el efecto de la limitación de sustrato, la inhibición por sustrato y la inhibición por producto, así como también la muerte celular en el crecimiento y metabolismo microbiano. El uso de estos modelos puede guiar al desarrollo de mejores estrategias para la optimización de los procesos de fermentación (Tango y Ghaly, 1999) y la mayoría de ellos han sido desarrollado principalmente para sustratos puros, sin embargo, se han reportado algunos estudios cinéticos para sustratos como melaza, almidón, harina de trigo y suero de queso para la producción de ácido láctico por fermentación (Anjana y Kumar, 2008).

Diversos modelos para la producción de ácido láctico por fermentación a partir de diferentes sustratos y microorganismos han sido reportados por la literatura científica. Por ejemplo, Ghaly y Tango (1999), propusieron las siguientes ecuaciones para la producción de ácido láctico a partir de suero lácteo utilizando como microorganismo *Lb. helveticus*, para el crecimiento celular (6), formación de producto (7) y utilización de sustrato (8), respectivamente:

$$\frac{dX_n}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_s + S} e^{-\left(\frac{S}{K_i}\right)^{n_1}} e^{-\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}} - K_d X \quad (6)$$

$$\frac{dP}{dt} = X \mu_m \alpha \frac{S}{K_s + S} e^{-\left(\frac{S}{K_i}\right)^{n_1}} e^{-\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}} - K_d + \beta \quad (7)$$

$$-\frac{dS}{dt} = -\frac{X}{Y_{X/S}} \mu_m \frac{S}{K_s + S} e^{-\left(\frac{S}{K_i}\right)^{n_1}} e^{-\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}} - K_d + m_s X + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \quad (8)$$

En donde K_s es la concentración de sustrato inicial a la mitad de la máxima velocidad de crecimiento específica, S es la concentración inicial de sustrato, μ_m es el crecimiento máximo específico, X es la concentración de células, K_i es la concentración de sustrato a la cual el factor de inhibición de sustrato es 0.368 (g/L), n_1 es la forma de la constante para la función exponencial, K_{ip} es la concentración inhibitoria de ácido láctico a la cual el factor de inhibición de producto es 0.368, P es la concentración de ácido láctico, n_2 es la forma de la constante para la función exponencial, m_s es el coeficiente de mantenimiento de energía y K_d es la velocidad específica de muerte celular.

Por su parte Altiok *et al.* (2006) estudiaron la producción de ácido láctico por fermentación de suero lácteo usando *Lb. casei* y reportaron un modelo cinético que describe el crecimiento celular, la formación de producto y la utilización de sustrato. La ecuación para el crecimiento de biomasa (9) fue desarrollada en base a la ecuación de crecimiento microbiano de Monod y a la ecuación logística (3).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^f \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^h \quad (9)$$

La ecuación para la formación de producto (5) es descrita por la cinética de Luedeking-Piret, mencionada anteriormente. El consumo de sustrato (10) puede ser expresado como la conversión de sustrato a producto y consumo de sustrato para su mantenimiento, donde m_s es el coeficiente de mantenimiento de energía y Y_{ps} es el rendimiento de producto con respecto al sustrato.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{PS}} \frac{dP}{dt} - m_s X \quad (10)$$

La forma de obtener los diferentes parámetros de las ecuaciones diferenciales para los modelos de Altiok *et al.* (2006) y Tango y Ghaly (1999) se resume en el cuadro 4.

Cuadro 4. Cálculos de los parámetros de las ecuaciones de Altiok *et al.* (2006) y Tango y Ghaly (1999).

Parámetro	Modelo Altiok <i>et al.</i> 2006	Modelo Tango y Ghaly (1999)
$\mu_{m\acute{a}x}$	$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S}$	$\frac{S}{\mu} = \frac{K_m}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{S}{\mu_{m\acute{a}x}}$
K_s	$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S}$	$\frac{S}{\mu} = \frac{K_m}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{S}{\mu_{m\acute{a}x}}$
$X_{m\acute{a}x}$	Datos experimentales	No aplica
$P_{m\acute{a}x}$	Datos experimentales	No aplica
f	No reportado	No aplica
h	No reportado	No aplica
α	$\alpha = \frac{P - P_0}{X - X_0}$	$\alpha = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}$
β	No reportado	$\beta = \frac{Y_{P/S}}{m_s}$
m_s	No reportado	$\beta = \frac{Y_{P/S}}{m_s}$

El uso de cualquier modelo tiene que ser validado en cada aplicación experimental de interés, para obtener su comportamiento contra el fenómeno y así afirmar los supuestos realizados o proponer otras alternativas de modelaje.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el ácido láctico y sus derivados, han atraído la atención del mundo de la investigación debido al uso tan versátil que poseen. Sin embargo, la explotación de todo su potencial depende en gran medida de cómo producirlo de una manera rentable con altos niveles de pureza. La principal barrera en la producción de ácido láctico de alta pureza se encuentra en el proceso de separación y purificación una vez realizada la fermentación. Es en esta etapa donde interviene la tecnología de membrana; los procesos de separación basados en la tecnología han mostrado su eficiencia y ventajas en la separación de diversos tipos de compuestos en comparación con otra clase de procesos de separación. Las membranas de nanofiltración han sido utilizadas en etapas de separación, purificación y concentración de ácidos orgánicos. Por otro lado, se requieren fuentes de sustrato baratas, de elevada disponibilidad y con alto rendimiento en la producción de ácido láctico por fermentación. Una alternativa es el suero de leche, un subproducto de la industria del queso, debido a la cantidad considerable de lactosa que contiene como componente sólido. Las industrias queseras en todo el mundo generan grandes cantidades de suero por litro de leche. Dado que en México se producen aproximadamente 1, 348,992 ton de suero de leche al año (SIAP, 2008), y su aprovechamiento es escaso, es relevante el uso del suero lácteo como fuente de sustrato para la producción de ácido láctico. Por lo anterior se pretende estudiar una alternativa novedosa para la separación de ácido láctico usando la tecnología de membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico una vez producido por fermentación. Además, se pretende encontrar un modelo matemático que permita predecir adecuadamente el proceso de producción de ácido láctico con el fin de optimizar el proceso en una etapa posterior.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el proceso de obtención de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo por *Lactobacillus casei* y su separación utilizando la tecnología de membranas.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de distintas concentraciones de sustrato y de inóculo inicial en un medio de cultivo a base de suero lácteo sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC334.
2. Evaluar el proceso de producción de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo a través de cinéticas de producción de biomasa y ácido láctico, y de la evolución del consumo de sustrato en un proceso tipo lote.
3. Evaluar la separación del ácido láctico del caldo de fermentación por medio de la tecnología de membranas de nanofiltración.
4. Modelar matemáticamente la producción de ácido láctico en un proceso fermentativo tipo lote, en lo referente a la formación de producto y biomasa, así como del consumo de sustrato a través del tiempo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

5.1.1 Microorganismo

Se empleó una cepa de *Lactobacillus casei* (ATCC334) obtenida de la Colección de Cultivos Tipo Americano. La cepa se conservó en caldo soya tripticaseína (Bioxon) adicionado de glicerol (15%) a -20°C.

5.1.2 Medio de Cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó suero lácteo dulce proveniente del Laboratorio de Productos Lácteos de la Universidad Autónoma de Querétaro, el cual recibió un tratamiento previo para la precipitación de proteínas que consiste en bajar el pH a 4.5 con ácido fosfórico, calentar el suero por 20 minutos a 90°C y dejar enfriar. Por último para separar las proteínas, el suero fue filtrado en papel Whatman número 42. La composición del medio de cultivo empleado en las fermentaciones fue el siguiente: suero desproteinizado suplementado con 10 g/L de extracto de levadura (Difco), 0.5 g/L de KH_2PO_4 (J.T. Baker), 0.5 g/L de K_2HPO_4 (J.T. Baker), 0.05 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker), 0.05 g/L de MnSO_4 (J.T. Baker). El pH fue ajustado con una solución de NaOH al 10%. El medio de cultivo fue esterilizado a 121°C por 15 min.

5.1.3 Preparación del inóculo

La activación de la cepa se realizó en condiciones asépticas transfiriendo una asada del cultivo almacenado a caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco) e incubando por 24 h a 37°C. Una vez activada la cepa, para la segunda resiembra se transfirió una asada a caldo MRS y se incubó a 37°C por un periodo de 5-8 h para tener al microorganismo en su fase exponencial o 24 h a 37°C cuando se requirió al microorganismo en su fase estacionaria. A cada inóculo preparado se le efectuó un recuento en placas de agar MRS mediante la técnica de vaciado en placa para garantizar una cantidad de entre 10^6 y 10^8 UFC/ml en el medio de cultivo. Las placas se incubaron a 37°C/24 h.

5.2 Métodos

5.2.1 Evaluación del nivel de inóculo y concentración de lactosa sobre el desarrollo de *Lb. casei*

Las cinéticas de crecimiento para *Lb. casei* se llevaron a cabo a partir de diferentes concentraciones de lactosa en suero lácteo (20, 30, 40, 50 g/L) y de diferentes porcentajes de inóculo inicial (1, 5, 10, 20 v/v) en fase de crecimiento exponencial y estacionaria, el experimento se realizó en un sistema de monitoreo automático Bioscreen. Se distribuyeron 270µl del medio de cultivo a base de suero lácteo con las diferentes concentraciones de lactosa en las placas del equipo y enseguida se inocularon 30 µl de las suspensiones con diferentes concentraciones de la cepa activada y lavada, cada tratamiento se realizó por triplicado y se incluyó como control negativo (300µl) de los medios sin inocular. El equipo fue programado para realizar lecturas cada 20 min a 37°C a 600 nm durante 48 h. La densidad óptica registrada por el equipo se relacionó con las UFC a partir de una curva de calibración realizada en el mismo equipo.

5.2.2 Producción de ácido láctico en fermentaciones tipo lote

Las fermentaciones en un proceso tipo lote se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen de 300 ml del medio de cultivo en un agitador orbital con control de temperatura (Lab-line 3527) operado a 150 rpm y 37°C. Los matraces fueron inoculados asépticamente con los cultivos de *Lb. casei*. Se tomaron muestras del caldo de fermentación a distintos tiempos para el análisis de lactosa, biomasa y ácido láctico.

Se estudiaron tres condiciones distintas de pH, la primera de ellas fue sin control de pH durante el proceso de fermentación y las siguientes fueron con pH controlado utilizando CaCO₃ como agente neutralizante:

- a) pH inicial de 6.5
- b) pH controlado a 6.5 (10g/L CaCO₃)
- c) pH controlado a 6.0 (6 g/L CaCO₃)

La productividad del proceso fermentativo para la obtención de ácido láctico fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Productividad de ácido láctico} = \frac{\text{Ácido láctico producido (g)}}{\text{Volumen inicial del medio} * \text{Tiempo (h)}}$$

5.2.3 Evaluación del funcionamiento de membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico

Se evaluó el funcionamiento de membranas de nanofiltración en la separación del ácido láctico, empleando soluciones de ácido láctico y lactosa a concentraciones similares a las encontradas en el caldo de fermentación al final del proceso. La separación del ácido láctico se realizó en un sistema experimental como el que se muestra en la Figura 6. El sistema consistió de un matraz Erlenmeyer donde se colocaba la solución a separar, un módulo de membrana (Figura 7) y una bomba. El módulo de membrana utilizado en el proceso es de flujo cruzado con una membrana de nanofiltración (SEPA CF II, Osmonics) con una presión máxima de operación de 1000 psig. El área de superficie de la membrana es de 140 cm² y el volumen de retención de la membrana es de 70 ml. Se utilizó una bomba de vacío (M03-S, Hydra cell) para bombear la solución a través del módulo de membrana.

Se tomaron muestras de las soluciones originales antes de iniciar la separación, en el permeado y retenido a diferentes tiempos (5, 20 y 40 min). Se probaron dos membranas de nanofiltración, denotadas CK y TFC-SR3 (Cuadro 5) y dos presiones en el flujo de salida del permeado, 150 y 300 psig para cada una de las membranas.

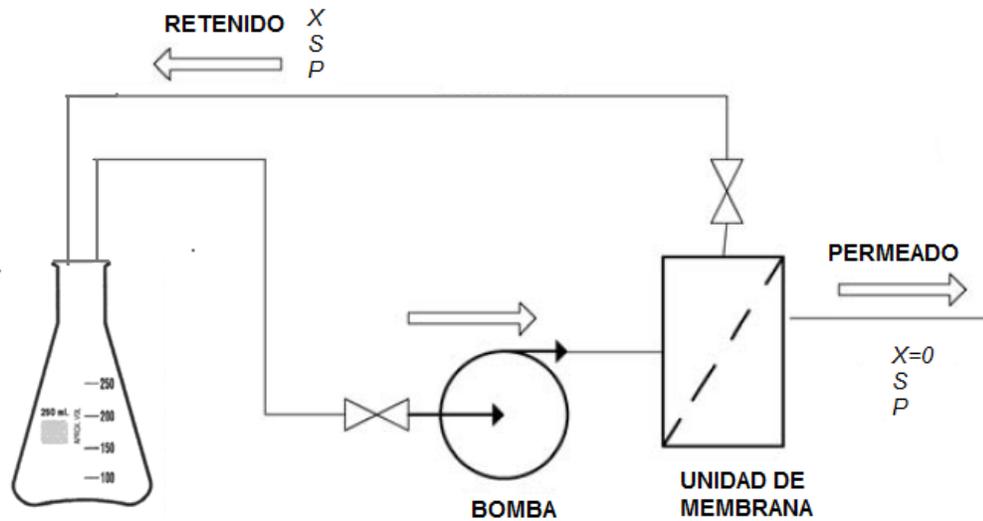


Figura 6. Esquema del sistema experimental para la producción y separación de ácido láctico.



Figura 7. Unidad de membrana (SEPA CF II, Osmonics) utilizada para la separación de ácido láctico.

El funcionamiento de las membranas fue evaluado usando tres criterios: El flujo de permeado, la retención de lactosa y la recuperación de ácido láctico en el permeado. El flujo de permeado fue calculado midiendo la cantidad de permeado recolectado durante un cierto tiempo y dividiendo dicho tiempo por el área de la membrana efectiva para la filtración:

$$\text{Flujo del permeado} = \frac{\text{Volumen permeado (L)}}{\text{Área membrna (m}^2\text{)} * \text{Tiempo(h)}}$$

Los porcentajes de retención de lactosa y recuperación de ácido láctico fueron definidos como:

$$\text{Retención de lactosa} = \frac{1 - C.L.P}{C.L.A} * 100$$

en donde:

C.L.P=Cantidad de lactosa en el permeado (concentración * volumen).

C.L.A= Cantidad de lactosa en el flujo de alimentación (concentración * volumen).

$$\text{Recuperación de ácido láctico} = \frac{C.A.L.P}{C.A.L.A} * 100$$

en donde:

C.A.L.P= Cantidad de ácido láctico en el permeado (concentración x volumen).

C.A.L.A= Cantidad de ácido láctico en el flujo de alimentación (concentración x volumen).

Cuadro 5. Especificaciones de membranas de nanofiltración utilizadas para la separación de ácido láctico.

Designación	Material de la capa superior	Tipo de Superficie	Tamaño de poro (MWCO)	Presión (psig)	Hidrofobicidad
TFC-SR3	Aleación de poliamida	Globular	200	100-500	Baja
CK	Acetato de celulosa	Rugosa	0	100-500	Alta

5.2.3.1 Limpieza de las membranas

Para llevar a cabo la limpieza de la membrana después de cada experimento fue necesario el siguiente procedimiento:

- 1.- Recirculación de agua tibia (35-45°C) de 20 a 30 minutos.
- 2.- Drenado del agua y repetir el paso 1 si la membrana está muy sucia.
- 3.- Recirculación de una solución de NaOH al 0.5% de 20 a 30 minutos.
- 4.- Drenado de la solución de limpieza y repetir el paso 1 y 2.
- 5.- Recirculación de una solución de HCl 0.1 N de 20-30 minutos.
- 7.-Drenado de la solución y repetir los pasos 1 y 2.
- 9.- Recirculación de una solución de 0.5% NaOH+0.5%EDTA de 20 a 30 minutos.
- 10.-Drenado de la solución y repetir el paso 1 y 2.
- 12.-Desinfección de la membrana con una solución de 0.5-1% de Formalina al 40%.
- 13.- Almacenamiento de lo membrana en una solución de formalina al 1.5%.

5.3 Técnicas Analíticas

5.3.1 Cuantificación de Ácido Láctico y Lactosa

Las concentraciones de ácido láctico y lactosa fueron determinadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El sistema de HPLC (Agilent Technologies 1200 Series) fue equipado con una columna ZORBAX Carbohydrate (Agilent Technologies) operada a 45°C, acoplado a un detector de índice de refracción mantenido a 35°C y controlado por el software Agilition ChemStation. La fase móvil fue H_3PO_4 al 0.1% a un flujo de 0.8 ml/min. Los tiempos de retención para la lactosa y ácido láctico fueron de 2.7 min y 3.6 min, respectivamente. Las curvas de calibración para lactosa y ácido láctico se muestran en la Figura A.1 y Figura A.2 del Anexo A.

Las muestras tomadas durante la fermentación fueron centrifugadas a 6,000 rpm por 15 min con el fin de separar la masa celular y otros componentes insolubles y el supernadante fue filtrado en filtros de celulosa Agilent de 0.45 μ m.

5.3.2 Determinación de Biomasa

La biomasa en el caldo de fermentación fue medida por densidad óptica a una longitud de onda de 610 nm en un espectrofotómetro Genesys 12. Para convertir la densidad celular a concentración de biomasa se utilizó una curva de calibración de densidad óptica vs peso seco (Figura 3. Anexo A).

5.4 Desarrollo del modelo matemático

La modelación del proceso de producción de ácido láctico fue basada en ecuaciones diferenciales propuestas por Altiok *et al.* (2006) quienes estudiaron la producción de ácido láctico por fermentación de suero lácteo usando *Lb. casei*. Dichas ecuaciones diferenciales permiten estudiar el crecimiento de la biomasa, la formación del producto y la utilización de sustrato durante la fermentación. La modelación de los datos experimentales utilizando estas ecuaciones fue evaluada con el programa estadístico JMP versión 5.0.1.

Para llevar a cabo la evaluación del crecimiento de biomasa se aplicó la ecuación 9, para la formación de producto se utilizó la ecuación 5 y el consumo de sustrato se evaluó por medio de la ecuación diferencial 10.

5.4.1 Estimación de parámetros

Para el cálculo de $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_S pertenecientes a la ecuación de Monod (Ecuación 1) fue necesario realizar un experimento en donde la concentración inicial de sustrato fue modificada y los otros factores del medio de cultivo se mantuvieron constantes para poder observar las características de la velocidad de crecimiento del microorganismo a diferentes concentraciones de sustrato.

La velocidad específica de crecimiento fue calculada de dos maneras, la primera de ellas fue a partir de la ecuación 11 y la segunda utilizando la ecuación 12, donde k representa una constante.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (11)$$

$$\frac{dX}{dt} = k \quad (12)$$

Asumiendo la ecuación 11, su integración da como resultado la ecuación 13, donde X es la concentración de biomasa y t es el tiempo, y la integración de la ecuación 12 resulta en la ecuación 14.

$$\mu = \frac{\ln X(t) - \ln X(t_0)}{t - t_0} \quad (13)$$

$$\mu = \frac{X(t) - X(t_0)}{t - t_0} \quad (14)$$

Una vez obtenidas las velocidades de crecimiento se aplico un ajuste no lineal de la ecuación de Monod (Figura 8) mediante el programa estadístico JMP 5.0.1 para obtener la estimación de los parámetros.

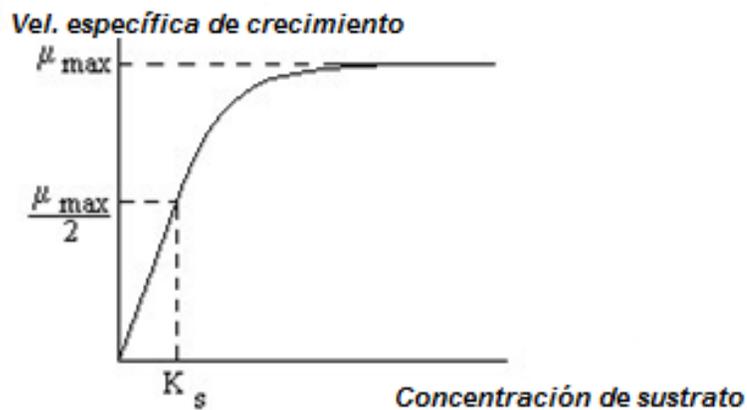


Figura 8. Cinética de Monod

Los coeficientes de rendimiento de biomasa y producto con respecto al sustrato fueron definidos como los coeficientes estequiométricos. El rendimiento de biomasa fue calculado como el peso de la biomasa producida por el peso del sustrato utilizado (Ecuación 15).

$$Y_{XS} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (15)$$

El rendimiento de producto fue definido como el peso del producto producido por el peso del sustrato utilizado (Ecuación 16).

$$Y_{PS} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (16)$$

Por otra parte los valores de $X_{m\acute{a}x}$ y $P_{m\acute{a}x}$, correspondientes a la biomasa y producto máximos alcanzados fueron observados de manera experimental.

5.5 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para encontrar las mejores condiciones de crecimiento de *Lb. casei* en suero lácteo suplementado se planteó un diseño experimental completamente al azar con dos repeticiones. El diseño de tratamientos fue trifactorial, los factores de estudio fueron: la concentración de sustrato (20, 30, 40, 50 g/L), el porcentaje de inóculo (1, 5, 10, 20 v/v) y la fase de crecimiento del microorganismo (fase exponencial y fase estacionaria). Asimismo se estableció un diseño experimental para evaluar la recuperación de ácido láctico por medio de las membranas de nanofiltración, en este caso se planteó un diseño completamente al azar con dos repeticiones, los factores de estudio fueron el tipo de membrana (CK y TFC-SR3), la presión (150 y 300 psig) y el tiempo al que se tomó la muestra en el permeado. Se tomó la muestra en el permeado a los tiempos: 5, 20 y 40 min.

Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y haciendo una comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) con el programa estadístico JMP versión 5.0.1, los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación del efecto de la concentración de sustrato inicial y el porcentaje de inóculo inicial en el crecimiento de *Lb. casei*

Para determinar las condiciones más adecuadas para el crecimiento de *Lb. casei* en un medio de cultivo de suero lácteo suplementado se llevó a cabo la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sustrato (20, 30, 40, 50 g/l) y diferentes porcentajes de inóculo inicial (1, 5, 10, 20% v/v) en dos fases de crecimiento, exponencial y estacionaria. Las cinéticas de crecimiento microbiano para todos los tratamientos aplicados se muestran en las Figuras 9 y 10.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado (Anexo B) los factores que influyen en el desarrollo del microorganismo (incremento en la población a las 20 h) son la concentración de sustrato y la interacción fase-inóculo. De sustrato se encontró que las mejores condiciones fueron 50 y 40 g/L y un inóculo al 1% en fase exponencial o un inóculo al 1% en fase estacionaria (Figuras 11 y 12). Según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) estas dos condiciones no mostraron diferencia significativa en el crecimiento del microorganismo. Por lo tanto se decidió probar estas condiciones a nivel matraz para verificar la producción de ácido láctico en la siguiente etapa experimental.

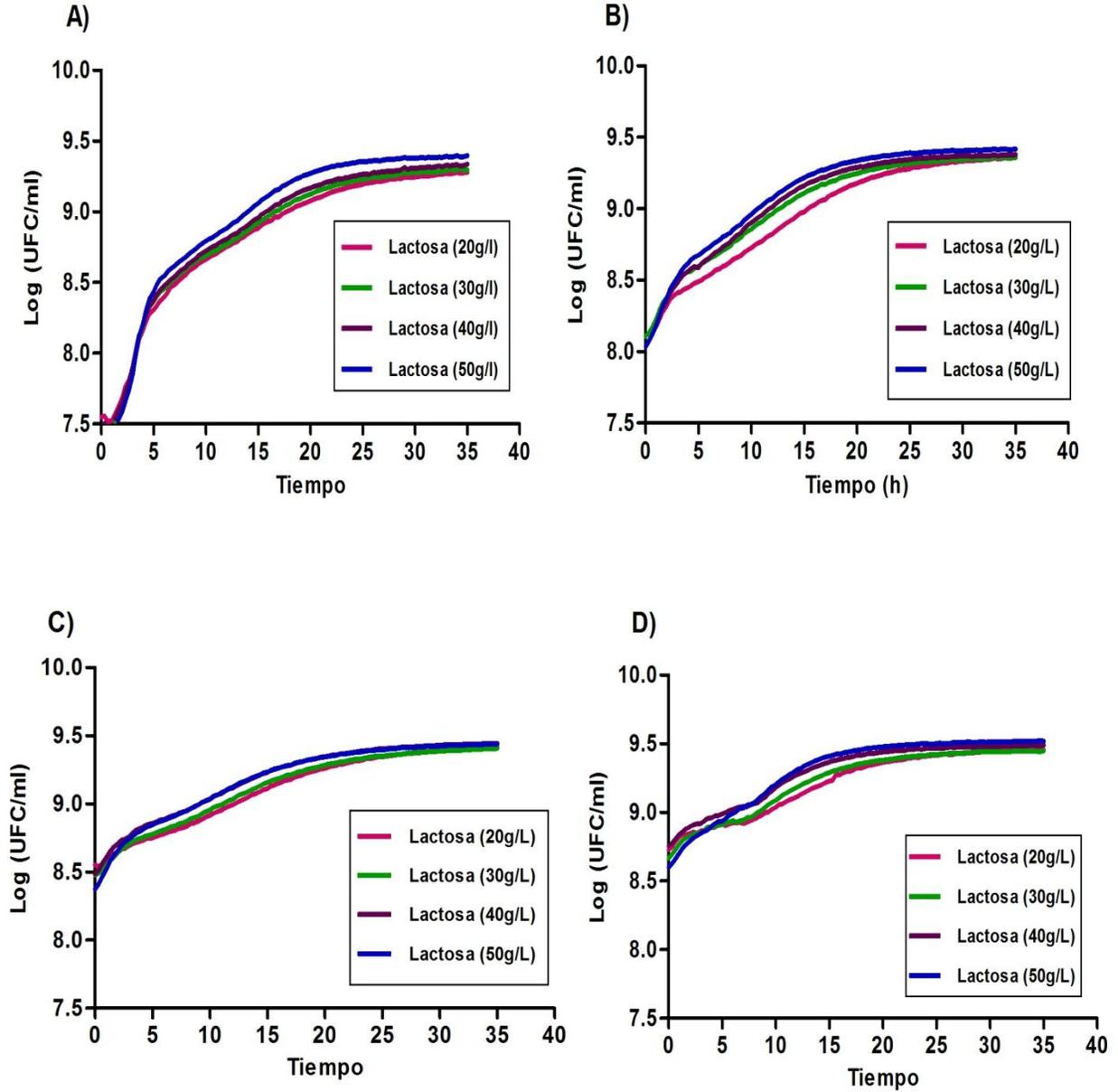


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *Lb. casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado, con diferentes concentraciones de lactosa (20, 30, 40, 50 g/L) y con inóculos (v/v) del 1% (A), 5% (B), 10% (C) y 20% (D), agregados en fase de crecimiento estacionaria.

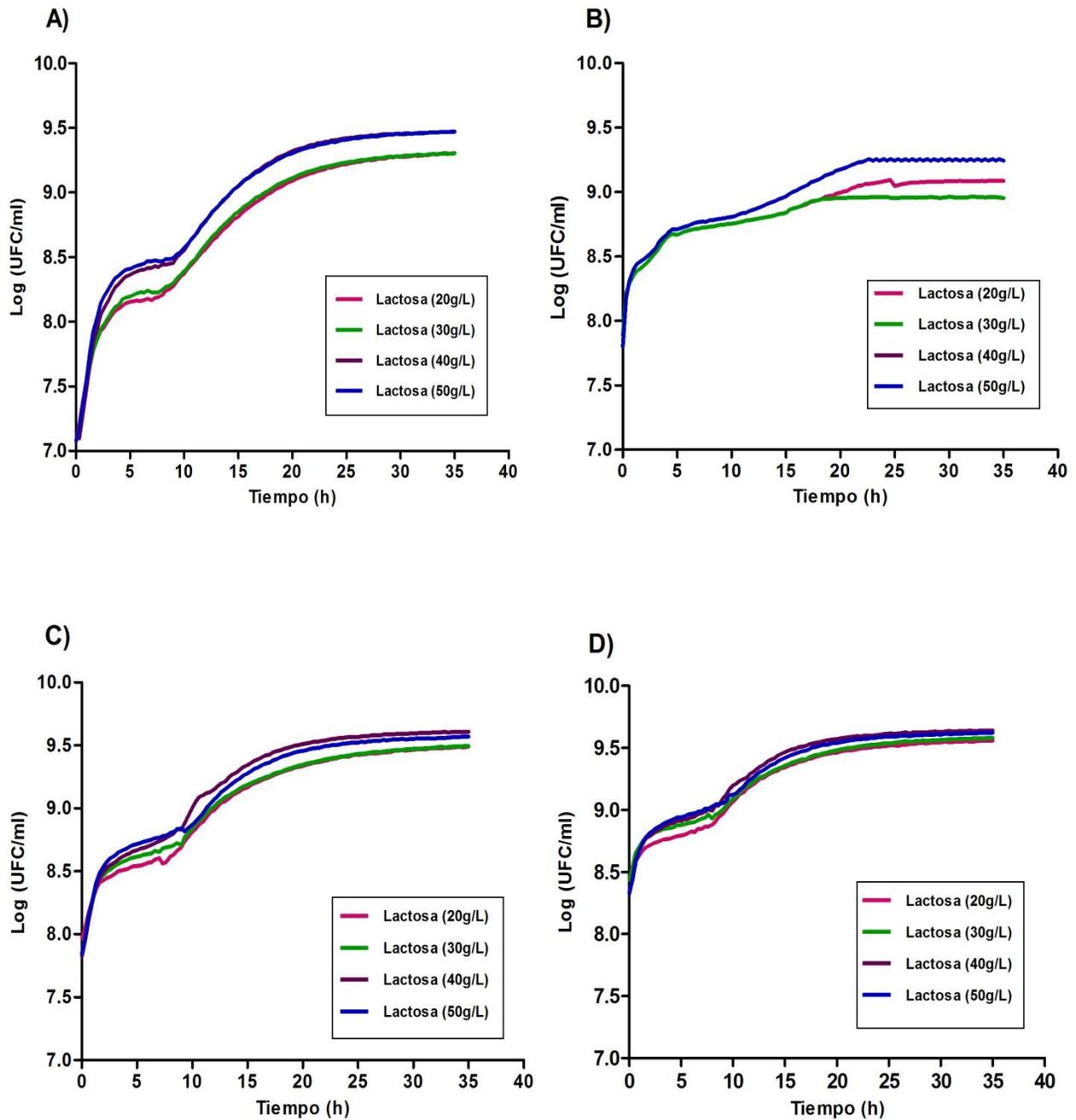


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de *Lb. casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado, con diferentes concentraciones de lactosa (20, 30, 40, 50 g/L) y con inóculos (v/v) del 1% (A), 5% (B), 10% (C) y 20% (D), agregados en fase de crecimiento exponencial.

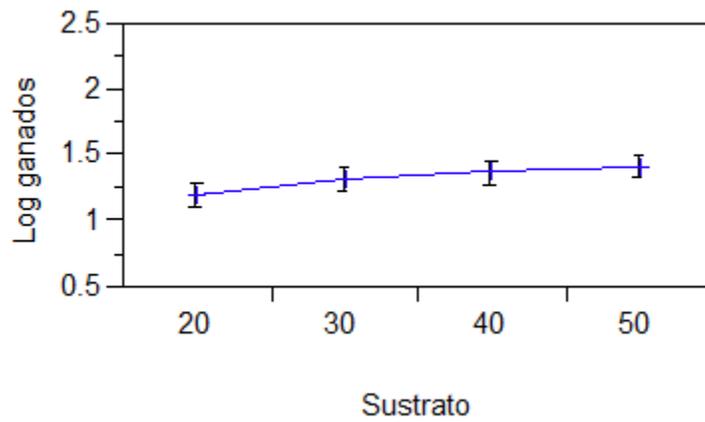


Figura 11. Efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento microbiano.

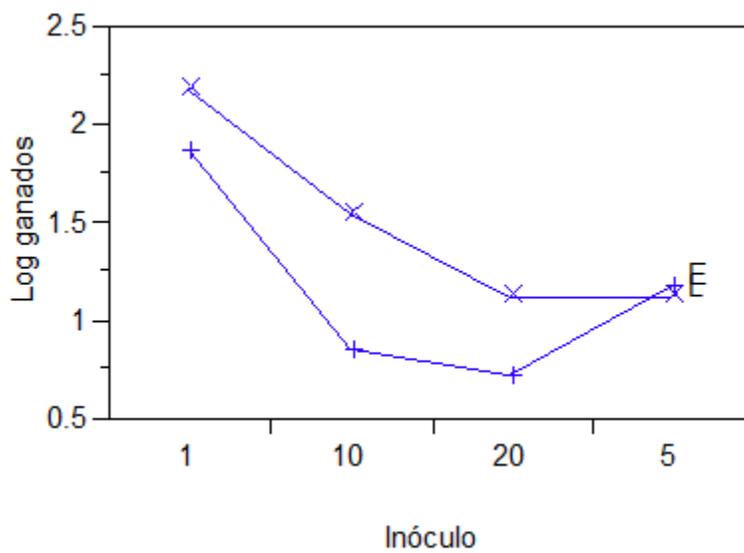


Figura 12. Efecto de la interacción entre la fase de crecimiento microbiano (estacionaria y exponencial) y los porcentajes de inóculo sobre el crecimiento microbiano.

Con la condición de 50 g/L de sustrato con 1% de inóculo en fase estacionaria se obtuvo una población máxima de 9.42 ± 0.01 log (UFC/ml) después de 20 h de iniciada la fermentación (Figura 9A) y se obtuvo un incremento en el crecimiento del microorganismo de 1.98 log (Figura 13). Con las mismas condiciones de cultivo pero el microorganismo en fase exponencial se alcanzaron 9.29 ± 0.01 log (Figura 10A) con 2.23 log de incremento (Figura 14). Cabe señalar que en ambas condiciones se observó un crecimiento rápido del microorganismo debido a que no se presentó una fase de latencia del microorganismo en el medio de cultivo a base de suero lácteo. Después de 7 horas de iniciada la fermentación ya se habían alcanzado alrededor de 8.5 log para ambas condiciones y la viabilidad fue incrementando hasta alrededor de las 20 horas. Las cinéticas correspondientes a estas dos mejores condiciones se muestran en la Figura 15.

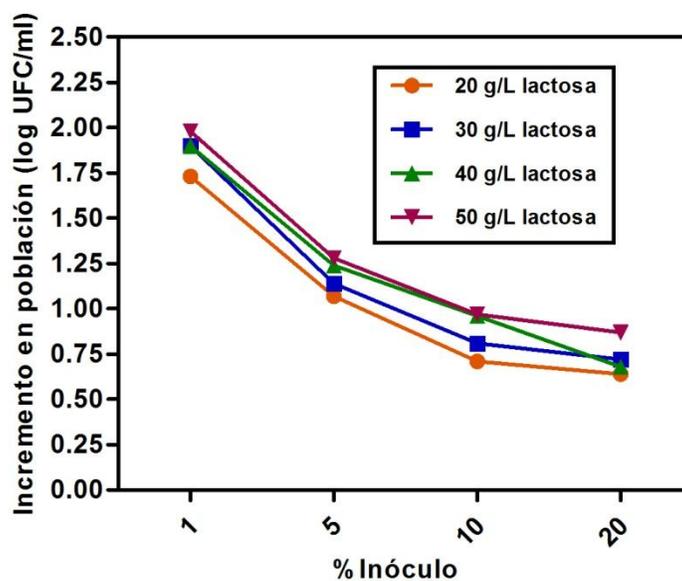


Figura 13. Log (UFC/ml) de crecimiento microbiano a las 20 h para los inóculos agregados en fase estacionaria en las diferentes concentraciones de sustrato.

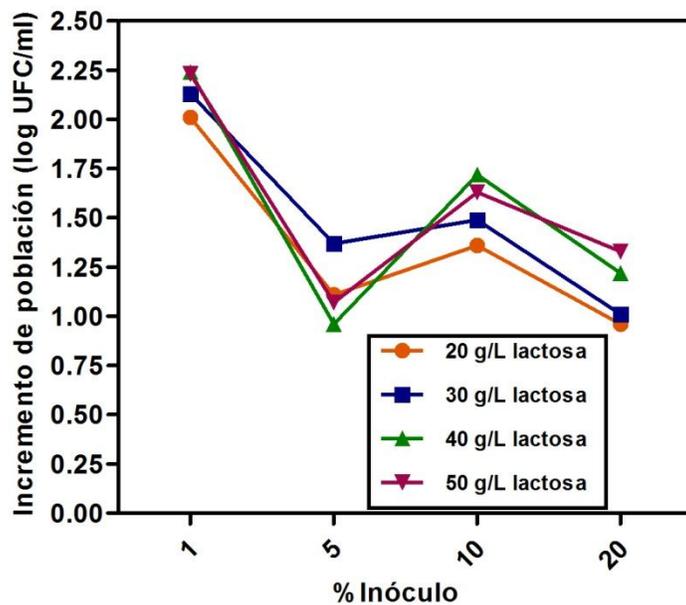


Figura 14. Log (UFC/ml) de crecimiento microbiano a las 20 h para los inóculos agregados en fase exponencial en las diferentes concentraciones de sustrato.

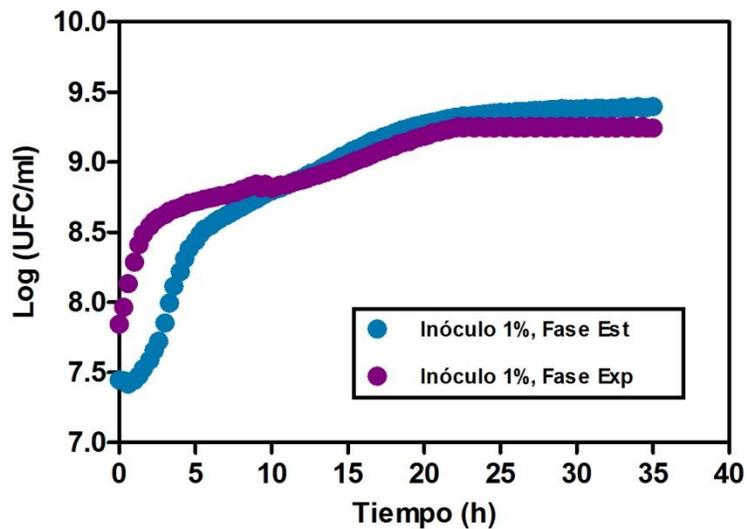


Figura 15. Cinéticas de crecimiento de *Lb. casei* con una concentración de lactosa en suero lácteo de 50 g/L, para la condición de 1% de inóculo agregado en fase estacionaria y 1% de inóculo agregado en fase exponencial.

Diversos autores han evaluado el crecimiento de *Lb. casei* en una gran variedad de sustratos. Pereira *et al.* (2010) encontraron que las condiciones óptimas para el crecimiento de *Lb. casei* en jugo de manzana fueron inóculos iniciales de 7.48 y 7.3 log (UFC/ml), con estas condiciones el microorganismo presentó un crecimiento rápido logrando una población máxima de 8.45 ± 0.06 y 8.49 ± 0.02 log (UFC/ml), respectivamente después de 14 horas. Con respecto a la cantidad de inóculo inicial, los resultados anteriores son similares a los obtenidos en el presente trabajo, dado que los porcentajes de inóculo de 1% en fase de crecimiento estacionaria y de 1% en fase de crecimiento exponencial corresponden a valores entre 7.0 y 7.5 log (UFC/ml). Sin embargo las poblaciones máximas alcanzadas fueron mayores en el presente trabajo, 9.42 ± 0.01 y 9.29 ± 0.01 log (UFC/ml), para ambas condiciones de inóculo inicial.

Asimismo Nancib *et al.* (2009) estudiaron el crecimiento de *Lb. casei* a partir de la fermentación de extractos de jugo donde consiguieron poblaciones máximas del microorganismo de 9 log (UFC/ml) en un tiempo de 19 horas usando un inóculo inicial de 10%(v/v) en fase exponencial, esta cantidad de células coincide con los 9.4 log (UFC/ml) obtenidos en la presente investigación cuando se probó la misma cantidad de inóculo inicial.

Otros autores, Yoon *et al.* (2004) probaron el crecimiento de *Lb. casei* usando como sustrato jugo de tomate y reportaron que el microorganismo alcanza una población mayor a 8 log (UFC/ml) después de 48 h de fermentación partiendo de un inóculo de 6 log (UFC/ml) en fase estacionaria y Yoon *et al.* (2005) investigaron de nuevo el crecimiento de *Lb. casei*, pero a partir de jugo de betabel, también partieron de un inóculo de alrededor de 6 log (UFC/ml) en fase estacionaria y encontraron resultados similares a los anteriores, consiguiendo un crecimiento alrededor de 9.2 log (UFC/ml) después de 48 h de fermentación. Lo anterior demuestra que el suero lácteo proporciona un crecimiento superior del microorganismo en un menor tiempo en comparación con jugos de vegetales usados como sustratos.

6.2 Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de suero lácteo

Durante la segunda etapa del presente trabajo se estudió la producción de ácido láctico usando *Lb. casei* a partir de la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote. Se tomaron como base las mejores condiciones de crecimiento del microorganismo obtenidas en la etapa anterior, es decir, la concentración de lactosa en el suero de 50 g/L, con 1% de inóculo inicial en fase exponencial y 1% de inóculo inicial en fase estacionaria. Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras cada hora.

Los resultados de la Figura 16 manifiestan que la producción de ácido es muy similar para ambos casos, 12.75 ± 0.25 g/L después de 24 h de fermentación empleando el microorganismo en fase estacionaria y 13.42 ± 0.44 con el cultivo en fase exponencial. A pesar de que la cantidad inicial de células en el inóculo agregado en fase exponencial es ligeramente menor en comparación con las células agregadas en fase estacionaria, dichas células empiezan su crecimiento inmediatamente una vez en el medio de cultivo, alcanzando un nivel similar de población máxima (Figura 15). Así también, las células agregadas en fase estacionaria logran un número grande de UFC/ml. Lo que demuestra que cuando se utiliza 1% de inóculo no hay diferencias significativas entre la fase de desarrollo del microorganismo para la producción de ácido láctico.

Cabe mencionar que para los experimentos posteriores se seleccionó la condición de 1% (v/v) en fase de crecimiento exponencial debido a que se requiere un menor tiempo para la preparación de la cepa y se logró una cantidad de ácido láctico ligeramente mayor.

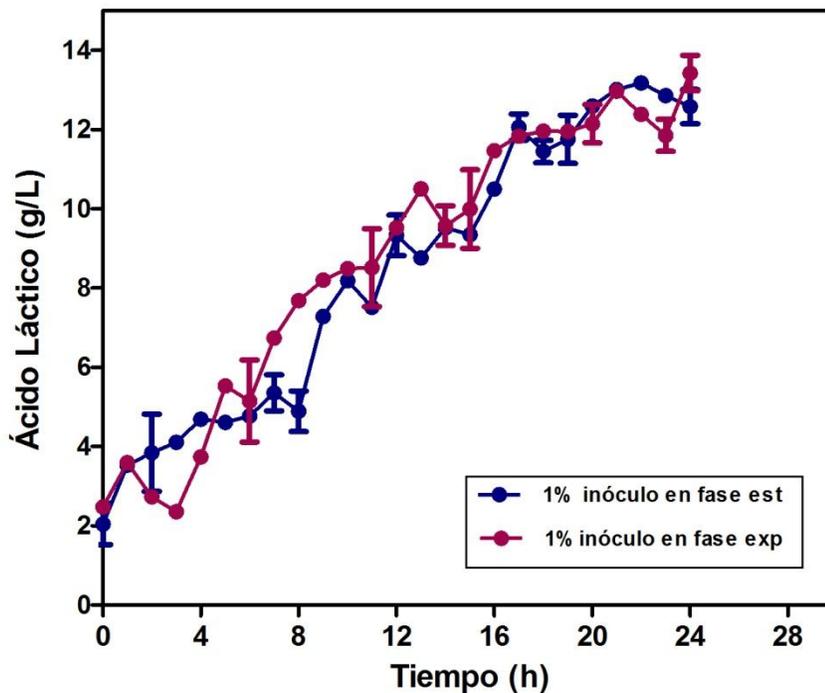


Figura 16. Producción de ácido láctico a través del tiempo a partir de las mejores condiciones obtenidas para el crecimiento del microorganismo.

6.3 Efecto del control del pH en el crecimiento del microorganismo, formación de producto y en el consumo de sustrato

En el presente estudio se evaluó el efecto que tiene el pH en la producción de ácido láctico en un proceso de fermentación tipo lote, así como en el crecimiento del microorganismo y en el consumo de sustrato a través del tiempo. Se estudiaron tres condiciones de pH del medio de fermentación, en la primera de ellas se partió de un pH inicial de 6.5 y posteriormente el pH no fue controlado; en la segunda condición el pH se controló a 6.5 y en la tercera el pH se mantuvo a 6.0

Con relación al crecimiento microbiano (Figuras 17A y 17B), durante las primeras 12 h se observa una tendencia similar en el crecimiento para las tres condiciones de pH, aunque el crecimiento sin control de pH es ligeramente mayor;

de forma congruente, la producción de ácido láctico es ligeramente mayor en esta misma condición (Figura 18). Después de las primeras 12 h la tendencia cambia, el crecimiento en la fermentación con pH controlado a 6.0 sigue aumentando, excede el crecimiento logrado en la fermentación sin control de pH hasta alcanzar 9.68 ± 0.01 log (UFC/ml) después de 24 h de fermentación lo que equivale a una biomasa de 1.15 (g/L), mientras que el crecimiento sin control de pH alcanza un valor máximo de 9.33 log (UFC/ml) equivalente a 1.09 g/L de biomasa y la fermentación con pH controlado a 6.5 mostró el menor crecimiento, con solo 8.80 ± 0.05 log (UFC/ml) alcanzados en el mismo tiempo lo que representa un valor de biomasa de 1.04 g/L.

Los valores de biomasa obtenidos en este trabajo en general son menores a los reportados previamente por Mussatto *et al.* (2009) quienes trabajaron con la producción de ácido láctico usando *Lb. delbrueckii* e hidrolizados de granos como sustrato y consiguieron valores de biomasa aproximadamente de 2 g/L para ambas condiciones, sin control de pH y bajo con control de pH (6.0). Sin embargo, resultados de biomasa inferiores a los nuestros han sido reportados para *Lb. casei* durante la producción de ácido láctico a partir de yogurt caducado por Alonso *et al.* (2010), ellos reportaron un valor máximo de 0.97 g/L bajo condiciones de pH controlado a 6.5 y Fajardo *et al.* (2008) reportan un valor máximo de biomasa para *Lb. casei* crecido en suero lácteo diluido de 0.33 g/L, que representa aproximadamente una tercera parte de los valores obtenidos en la presente investigación.

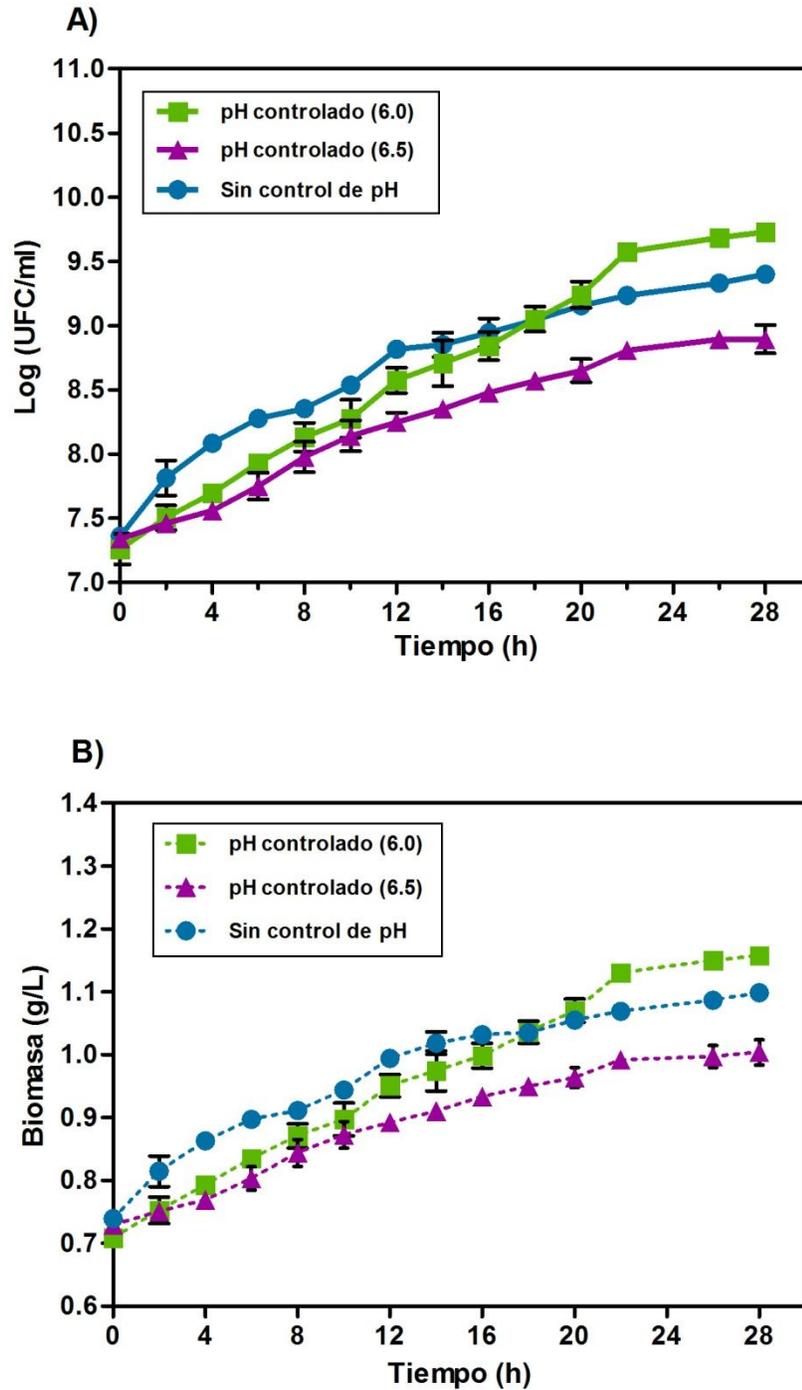


Figura 17. Cinética de crecimiento de *Lb. casei* (A) y formación de biomasa durante el crecimiento del microorganismo (B) en la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote.

Los resultados obtenidos con respecto a la producción de ácido se muestran en la Figura 18 donde se observa que durante las primeras 15 h, las fermentaciones realizadas con y sin control de pH mostraron un compartimiento similar. Sin embargo, después de este tiempo la producción de ácido láctico sí fue influenciada notablemente por el pH. Después de las primeras 15 h, cuando la fermentación fue controlada a pH de 6.0, la generación de ácido láctico fue en constante aumento, ascendiendo de manera lineal hasta obtenerse una cantidad máxima de 25.01 ± 0.27 g/L después de 21 h de horas, lo que equivale a una productividad máxima de 2.08 g/L h; mientras que cuando el pH se controló a 6.5, después de las primeras 15 h, la generación de ácido láctico casi no aumentó, permaneciendo casi constante, de esta forma la producción fue solo de 6.71 ± 0.05 g/L y sin control de pH se alcanzaron 12.45 ± 0.52 g/L, lo que representa productividades de 1.12 y 1.45 g/L h, respectivamente.

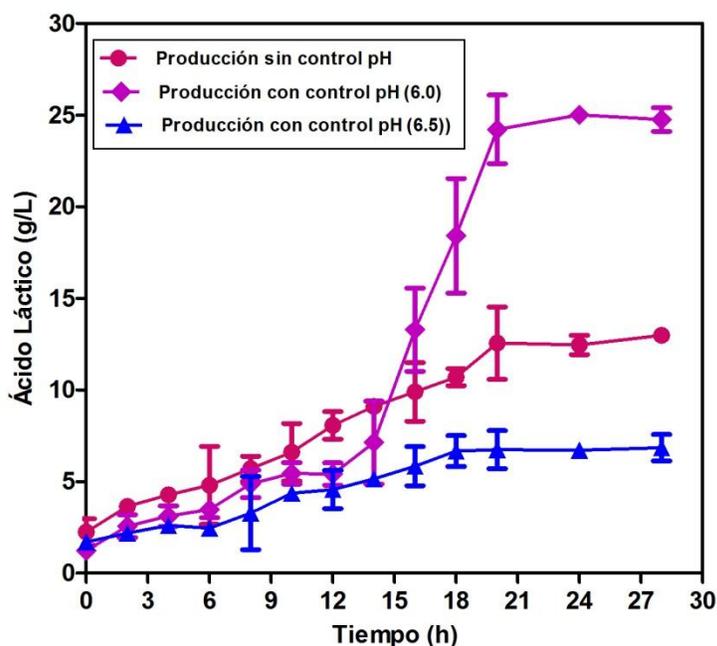


Figura 18. Producción de ácido láctico en la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote.

En cuanto al consumo de sustrato (Figura 19), la mayor disminución de sustrato se logró en la fermentación controlada a pH 6.0, donde la lactosa disminuye de 40.91 ± 1.04 a 11.16 ± 0.82 g/L, lo que significa que después de 24 h de iniciada la fermentación, ya se había consumido aproximadamente el 75% de sustrato; este resultado concuerda con la mayor producción de ácido y el mayor crecimiento microbiano obtenidos para esta misma condición de pH. El hecho de que no se logre un consumo de sustrato completo y aún así se logre una importante producción de ácido láctico sustenta lo reportado para otro tipo de sustratos, betabel e hidrolizados de granos (Monteagudo *et al.*, 1997; Mussatto *et al.*, 2008). En contraste, el consumo de lactosa solamente disminuye de 42.19 ± 0.02 a 29.96 ± 0.31 g/L en la fermentación controlada a pH 6.5, lo que representa sólo un 25% de sustrato consumido y de 42.59 ± 0.50 a 23.27 ± 0.84 g/L en la fermentación sin control de pH, equivalentes a un 62.5% de sustrato consumido.

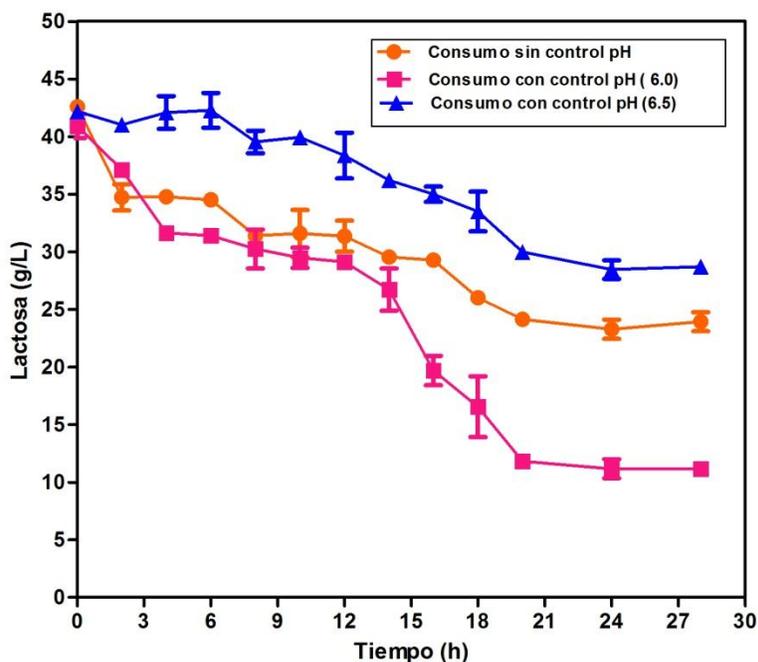


Figura 19. Concentración residual de sustrato mostrado a través del tiempo en la fermentación de suero lácteo suplementado en un proceso tipo lote.

La producción de ácido láctico por fermentación a partir de distintos sustratos con alto contenido de azúcares ha sido objeto de estudio de diversos autores. Mussatto *et al.* (2008) estudiaron la producción de ácido láctico a partir de un medio de cultivo suplementado a base de hidrolizados de grano cervecero en un proceso tipo lote y compararon la producción de ácido láctico en un medio de fermentación con un pH controlado a 6.0 contra un medio de fermentación sin control de pH partiendo de un pH de 6.0. Ellos reportaron que la producción de ácido láctico en el medio de cultivo con pH controlado es de 35.54 g/L partiendo de una concentración de glucosa como sustrato de 50 g/L en un tiempo de fermentación de 60 h, la cual disminuye hasta 15 g/L; mientras que en el medio sin control de pH sólo se obtuvo una cantidad de ácido láctico de 13.02 g/L, y la reducción de glucosa fue de 50 g/L a 37 g/L. Aunque en el presente trabajo se obtuvieron valores un poco menores de ácido láctico (25 g/L), es importante mencionar que la tendencia respecto a las fermentaciones sin y con control de pH, coincide en el sentido de que la producción de ácido láctico con control de pH (6.0) es casi el doble de la obtenida en la fermentación sin control de pH y el porcentaje de sustrato consumido con control de pH (6.0) es parecido en ambos casos. Por otra parte, en el presente trabajo, el tiempo de fermentación fue mucho menor (24 h), lo que se refleja en una mayor productividad, a partir de una menor concentración de sustrato.

Por su parte Alonso *et al.* (2010) investigaron la producción de ácido láctico usando como sustrato yogurt caducado suplementado con extracto de levadura y *Lb. casei* como microorganismo en fermentaciones tipo lote sin y con control de pH, quienes encontraron valores máximos de ácido láctico similares a los nuestros; reportan un valor máximo de ácido láctico de 14.5g/L para la fermentación sin control de pH a las 34 h de iniciada la fermentación y de 23 g/L para la fermentación con control de pH también a las 34 h, mientras en este trabajo se lograron concentraciones similares de ácido láctico, pero en un tiempo de 24 h. El consumo de sustrato, en este caso, no es adecuado para fines comparativos debido a que el yogurt, comparado con el suero lácteo, además de

contener lactosa, contiene gran cantidad de glucosa y fructosa, lo que provoca que el microorganismo los asimile de manera distinta.

Cabe destacar que aunque la cantidad de ácido acético como posible subproducto formado durante la fermentación del suero lácteo no fue medida en esta investigación, se ha reportado que el *Lb. casei* no es productor de ácido acético a partir de la fermentación de suero lácteo en procesos tipo lote (Fajardo *et al.*, 2008).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos para la condición de pH controlado a 6.5 no fueron los esperados, Büyükkileci y Harsa en el 2004 reportaron que el *Lb. casei* tiene un rango de crecimiento óptimo de 5.5-6.5 por lo que se esperaba una mayor producción de ácido láctico para el valor de pH de 6.5. La falta de crecimiento del microorganismo y de producción de ácido láctico se atribuye a que la cantidad de CaCO_3 agregada alcanzó una concentración crítica lo que provocó el fenómeno de floculación en el caldo de fermentación que se puede presentar a altas concentraciones de lactato de calcio; este fenómeno causa que la masa se consolide y por consiguiente que la fermentación sea incompleta, sin embargo los componentes nutricionales pudieron ser suficientes y quedarse en el caldo lo que permite que exista cierto crecimiento del microorganismo (Hetényi *et al.*, 2011).

El pH es uno de los principales factores que influyen en la producción de ácido láctico por procesos de fermentación debido a que la actividad metabólica de los microorganismos depende del pH intracelular. Algunos autores (Kashket, 1987; Yoo *et al.*, 1996; Hofvendahl y Hägerdal, 1997; Mussatto *et al.*, 2008), reportan que los ácidos débiles, como el ácido láctico, inhiben el crecimiento bacteriano debido a que el pH externo declina conforme aumenta la producción de ácido, lo que provoca que el ácido se encuentre protonizado, o sea sin disociar, tan pronto como es exportado fuera de la bacteria. Normalmente el pH intracelular se mantiene más alto que el pH del cultivo, esta diferencia es mayor conforme disminuye el pH del medio. Cuando el ácido no está disociado, se difunde al interior de la célula apoyándose en la permeabilidad de la membrana celular y se

disocia debido al pH intracelular más alto y en consecuencia la célula tiene que usar ATP para bombear fuera el exceso H^+ . En presencia de grandes concentraciones de ácido láctico la diferencia entre el pH del medio extracelular y el pH intracelular es muy grande causando que las células no sean capaces de expulsar H^+ lo suficientemente rápido para alcalinizar el citoplasma, y por consiguiente la célula realiza un gasto de energía cada vez mayor para tratar de mantener un pH intracelular alcalino, causando que el crecimiento celular se detenga y finalmente la bacteria muera.

Cuadro 6. Características de la producción de ácido láctico por *Lb. casei* a partir de suero lácteo en diferentes condiciones de pH después de 24 h de fermentación.

	Fermentación con pH controlado (6.0)	Fermentación con pH controlado (6.5)	Fermentación sin control de pH
Ácido Láctico (g/L)	25.01	6.71	12.45
Productividad (g/L h)	2.08	1.03	0.55
Biomasa (g/L)	1.15	0.99	1.08
Lactosa inicial (g/L)	40.19	42.19	42.59
Lactosa final(g/L)	11.16	29.96	23.27
$Y_{P/S}$ (g/g)	0.84	0.54	0.64
$Y_{P/X}$ (g/g)	0.014	0.022	0.018

6.4 Análisis de los perfiles de formación de producto, biomasa y consumo en la condición de pH 6.0

En el *Lb. casei* los azúcares de los sustratos se metabolizan a través de la ruta metabólica llamada glucólisis, también denominada vía de Emden-Meyerhof (Sección 2.3.2). La glucólisis se puede dividir en tres etapas principales, cada una de las cuales comprende una serie de reacciones individuales catalizadas enzimáticamente. La etapa I incluye una serie de reacciones preparatorias que no implican oxidación ni reducción y que no liberan energía, pero que conducen a la producción de dos moléculas del intermediario clave gliceraldehído-3-fosfato. En la etapa II ocurre un proceso redox, la energía se conserva en forma de ATP, y se forman dos moléculas de piruvato. En la etapa III tiene lugar una segunda reacción redox y se originan los productos de fermentación (por ejemplo, ácido láctico, etanol y CO₂). En el caso de *Lb. casei* se produce principalmente ácido láctico. El resultado final de la glucólisis es el consumo de glucosa, la síntesis neta de dos ATPs y la formación de productos de fermentación (Madigan *et al.*, 2004).

Dado que los productos de fermentación se forman en la tercera etapa del metabolismo, se especula que es por esta razón que la producción de ácido láctico es notablemente mayor después de 12 h (Figura 20). De esta manera el ácido láctico se comienza a producir en mayor cantidad a la mitad de la fase de crecimiento exponencial (12 h) y su producción continúa hasta al final de la fase exponencial, alrededor de las 20 h. Mientras tanto, la energía que se genera en forma de ATP durante la glucólisis es utilizada por las células para llevar a cabo complejas reacciones químicas que tienen como finalidad el crecimiento del microorganismo. La formación de biomasa es de manera constante hasta cerca de las 24 h, después de este tiempo el crecimiento de la bacteria comienza a detenerse con lo que da inicio la fase estacionaria (Figura 20).

Durante la fase de crecimiento la lactosa, se descompone en dos azúcares glucosa y galactosa, por medio de un sistema enzimático que se encuentra en la bacteria, algunas veces la bacteria necesita cierto tiempo para adaptar este sistema enzimático para la hidrólisis de la lactosa, lo que puede

ocasionar que el consumo de sustrato se realice de una manera lenta al inicio de la fermentación (Álvarez *et al.*, 2010). Ambos azúcares, la glucosa y galactosa son metabolizados posteriormente para la generación de energía y de productos de fermentación. Al final de la fase de crecimiento, la mayor parte del sustrato ha sido consumido, por lo que la poca cantidad de sustrato disponible se convierte en un factor limitante de crecimiento.

De acuerdo con Idris y Suzana (2006) la producción de ácido láctico depende del crecimiento bacteriano, así que el incremento en la población del microorganismo promueve un incremento en la producción de ácido láctico. Durante la fermentación de residuos de piña para la producción de ácido láctico dichos autores observaron que la biosíntesis del ácido láctico se llevó a cabo durante la fase de crecimiento del microorganismo. En el presente trabajo se consiguieron resultados similares, en donde se observa que la producción de ácido láctico comienza a incrementarse de forma considerable cerca de la mitad de la fase de crecimiento exponencial, alrededor de las 21 h se obtiene la mayor cantidad de ácido láctico y este tiempo coincide con la etapa final de la fase de crecimiento exponencial de la bacteria.

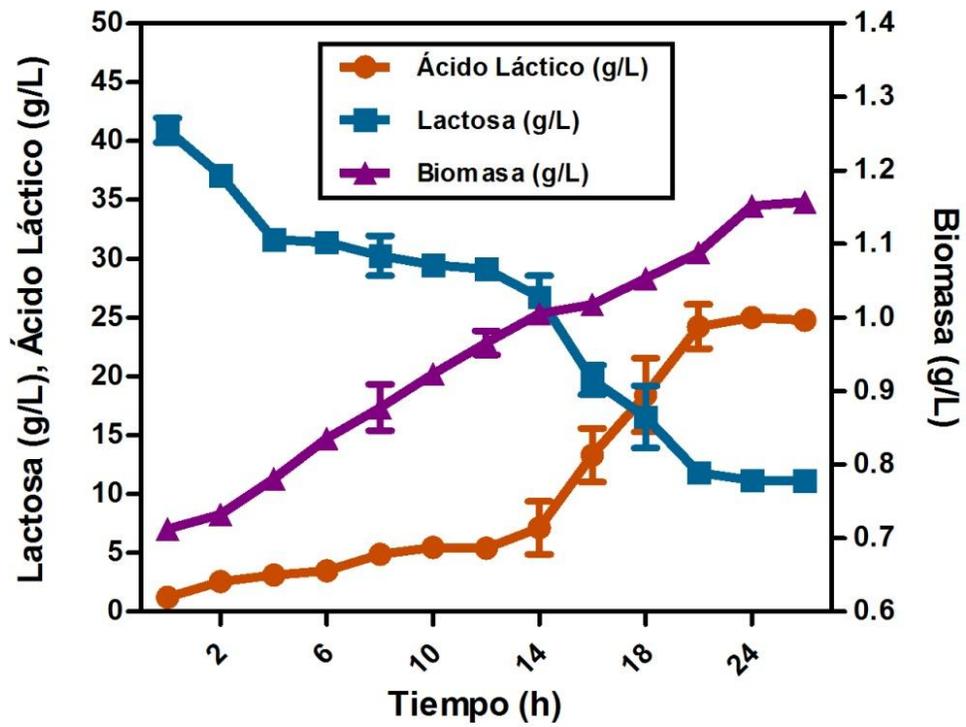


Figura 20. Perfil de la producción de ácido láctico, consumo de sustrato, formación de biomasa a un pH controlado de 6.0.

6.5 Evaluación de la separación de ácido láctico por medio de membranas de nanofiltración

En la última parte experimental se llevó a cabo la evaluación el funcionamiento de membranas de nanofiltración en la separación de ácido láctico, para lo cual se probaron dos membranas, denominadas CK y TFC-SR3. El análisis estadístico (Anexo B), mostró que los factores de estudio, presión en el flujo del permeado (150 y 300 psig) y el tiempo de separación (5, 20 y 40 min) no son significativos en la separación de ácido láctico y recuperación de lactosa (Figuras 21, 22, 23, 24), a diferencia del tipo de membrana. Los resultados señalan que la membrana CK retiene un alto porcentaje de ambos compuestos, $88.70\% \pm 0.66$ de ácido láctico y $83.77\% \pm 3.26$ de lactosa. Con respecto a la membrana TFC-SR3, los resultados muestran que retiene un alto porcentaje de ácido láctico y un bajo porcentaje de lactosa. Se consiguió una recuperación de ácido láctico de $75.07\% \pm 1.43$ y de lactosa de $4.11\% \pm 0.18$ (Figura 25 y 26).

Los resultados con respecto a la alta retención de lactosa con la membrana TFC-SR3 coinciden con los reportado por Pontalier *et al.* (1997) quienes estudiaron la separación de lactosa y glucosa utilizando una membrana con las mismas características de la TFC-SR3, es decir, de capa delgada, compuesta de poliamida.

Li y Shahbazi (2006) estudiaron la separación de ácido láctico de caldo de fermentación usando membranas de nanofiltración de material similar a la membrana TFC-SR3 utilizada en la presente investigación, y reportaron altos porcentajes de retención de lactosa (94.7%) y altos porcentajes de recuperación de ácido láctico (76.9%) a una presión de 1.4 MPa (200 psig).

Por otra parte Weng *et al.* (2009) evaluaron la separación de ácido acético a partir de soluciones artificiales de ácido acético y xilosa y reportan tendencias similares a las encontradas en este trabajo para la separación de ambos compuestos, encontraron porcentajes de retención de xilosa alrededor del 60% y de ácido láctico cerca del 0%, a una presión de 9.8 bar (147 psig) con una

membrana de nanofiltración (150-300 MWCO) fabricada del mismo material que la membrana TFC-SR3.

En el presente trabajo también se evaluó el flujo de permeado al inicio de la separación a dos diferentes presiones (150 y 300 psig) para las dos membranas (CK y TFC-SR3), de acuerdo al análisis estadístico (Anexo B), la presión fue solamente el factor significativo en el flujo de permeado (Figura 27), donde se puede observar que se logró un flujo mayor cuando se trabajó con la presión más alta (300 psig). Para la presión de 150 psig, el flujo fue $7.38 \text{ L/m}^2\text{h} \pm 0.44$ y para 300 psig el flujo fue de $11.13 \text{ L/m}^2\text{h} \pm 0.63$. Li *et al.* (2008) evaluaron el flujo de permeado en membranas de nanofiltración similares a las usadas en este trabajo y reportan un flujo de $18 \text{ L/m}^2\text{h}$ para una presión de 1.4 MPa (200 psig), el cual es mayor a los obtenidos en la presente investigación.

La retención de pequeños compuestos orgánicos por nanofiltración depende no sólo de las propiedades físicas, sino también de las propiedades químicas. La exclusión por tamaño es uno de los principales factores físicos que afectan la separación por membranas de nanofiltración (Bellona *et al.*, 2004; Boussu *et al.*, 2008; Weng *et al.*, 2009), es decir, la relación entre el tamaño molecular del compuesto a separar y del poro de la membrana a utilizar. En este caso, la lactosa tiene un peso molecular de 360.32 g/mol, el cual es mayor al tamaño de corte de las dos membranas de nanofiltración utilizadas en el presente trabajo (Ver cuadro 5). En contraste, el peso molecular del ácido láctico es de 90.08 g/mol, el cual es menor del tamaño de corte de la membrana TFC-SR3 y es comparable con el de la membrana CK. Por consiguiente, se esperaba que el ácido láctico atravesara los poros de las membranas mientras que la lactosa por su mayor tamaño molecular fuera retenida en ambas membranas. No obstante, los resultados obtenidos no fueron los esperados para ambas membranas de nanofiltración TFC-SR3 (200 MWCO) y CK (0 MWCO), ya que se esperaba un alto porcentaje de ácido láctico y un bajo porcentaje de lactosa en permeado debido a los tamaños de poro de las membranas. Los resultados mostraron que la membrana CK no logró una adecuada separación de ácido láctico de la lactosa y

que la membrana TFC-SR3 sí logró una buena separación de ambos compuestos, consiguiendo un alto porcentaje de ácido láctico y un bajo porcentaje de lactosa de recuperación en el permeado (Figura 25 y 26).

Un factor químico que puede afectar la separación en la tecnología de membranas es el efecto de la carga (Weng *et al.*, 2009), si el compuesto a separar se encuentra cargado, su retención se puede ver influenciada. Considerando que el ácido láctico tiene un pKa de 3.86 a 25°C (González *et al.*, 2008). A un pH de 2.7 solamente el 6.47% de ácido láctico está disociado, considerando que las soluciones artificiales usadas en los experimentos tenían un pH de alrededor de 2.5, prácticamente la mayor parte del ácido láctico se encontraba en su forma no disociada. Es claro que un cambio en el pH podría influenciar el grado de disociación del ácido láctico, sin embargo en este caso, el pH de las soluciones se mantuvo alrededor el 2.5 por lo que se considera que el ácido láctico se encontraba prácticamente en su forma no disociada, o sea sin carga. Por otra parte se ha reportado que los azúcares son neutros en soluciones acuosas (Goulas *et al.*, 2002). Por lo anterior se atribuye que el efecto de la carga fue despreciable para ambos compuestos.

Ha sido reportado que las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las membranas juegan un papel importante en el funcionamiento de la separación en membranas de nanofiltración (Bellona *et al.*, 2004; Cuartas-Urbe *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010), y que la retención de compuestos no cargados depende de las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de los compuestos a separar (Bellona *et al.*, 2004; Mänttari *et al.*, 2006; Boussu *et al.*, 2008). Benítez *et al.* (2011) reportan que el material con que está fabricada la membrana CK, acetato de celulosa, presenta un carácter hidrofóbico y que las membranas fabricadas de una aleación de un film delgado de poliamida como es el caso de la membrana TFC-SR3 presentan un carácter hidrofílico. Así también, se atribuye que la presencia de varios grupos OH en la estructura química de lactosa (Figura 2) le confieren un carácter altamente hidrofílico, mientras que la molécula de ácido láctico (Figura 1) presenta un carácter menos hidrofílico debido a la menor

presencia de grupos OH. Por lo anterior, se puede decir que los grupos OH de la molécula de lactosa tiene una alta afinidad por el material hidrofílico del que está fabricada la membrana TFC-SR3 y por consecuencia hay una mayor retención de este compuesto, mientras que el ácido láctico por su carácter menos hidrofílico tiene una menor afinidad por la membrana y por consecuente pasa con mayor facilidad la membrana, obteniéndose una mayor cantidad de este compuesto en el permeado. Esto aunado a que el ácido láctico tiene un tamaño menor que el poro de la membrana lo que permite también su paso a través de la membrana. Por otro lado, se piensa que la membrana CK por su carácter hidrofóbico es incapaz de retener ambos compuestos, a pesar de que el tamaño de poro nominal reportado por el proveedor sea de 0 MWCO.

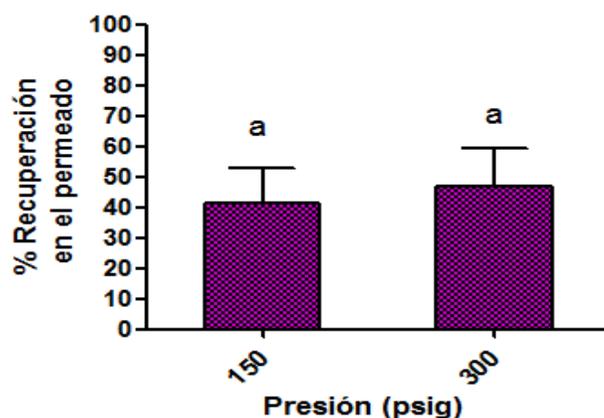


Figura 21. Efecto de la presión en la recuperación de lactosa.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

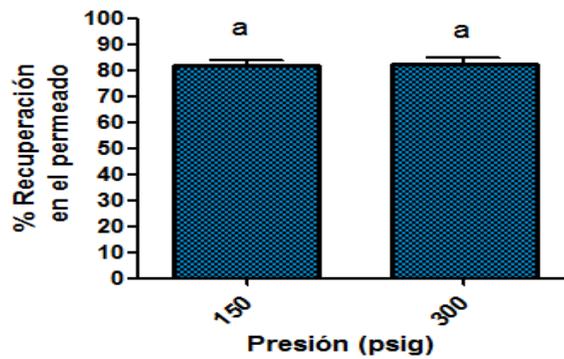


Figura 22. Efecto de la presión en la recuperación de ácido láctico.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

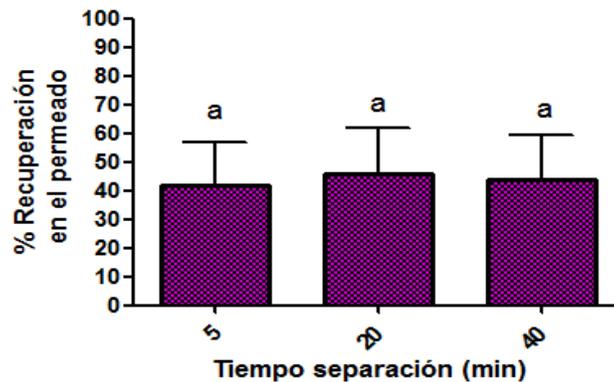


Figura 23. Efecto del tiempo en la recuperación de lactosa.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

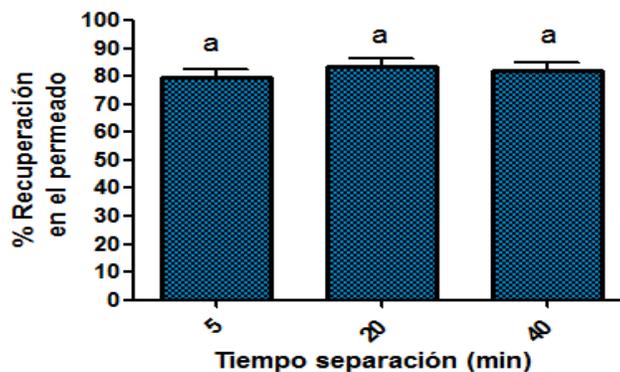


Figura 24. Efecto del tiempo en la recuperación de ácido láctico.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

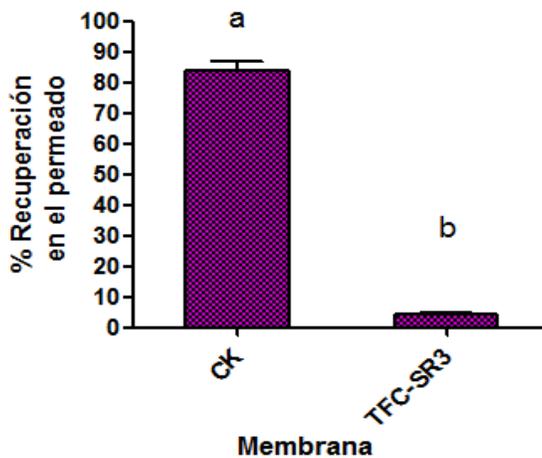


Figura 25. Efecto de la membrana en la separación de lactosa.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

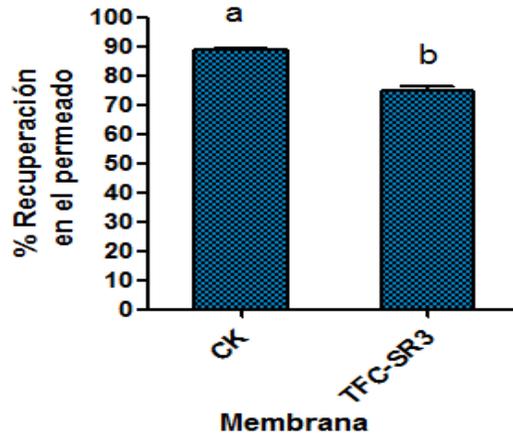


Figura 26. Efecto de la membrana en la separación de ácido láctico.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

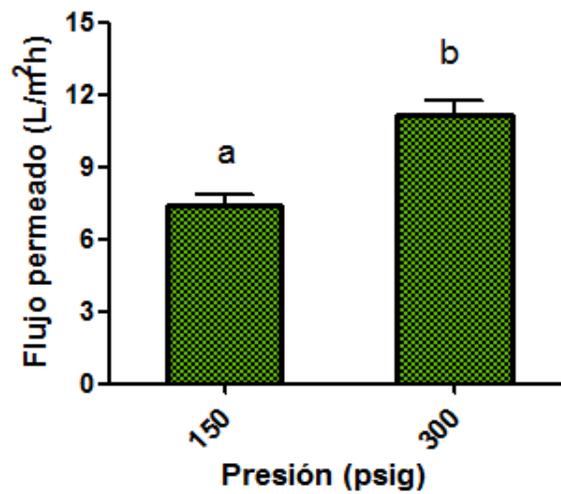


Figura 27. Efecto de la presión en el flujo del permeado.

Los resultados son la media de dos repeticiones \pm el error estándar. Letras diferentes por barra indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) prueba de Tukey.

6.6 Desarrollo del modelo

6.6.1 Determinación de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S

Para llevar a cabo la determinación de los valores de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S se llevó a cabo un ajuste no lineal de la ecuación de Monod con las velocidades específicas obtenidas a partir de la ecuación 13 (Cuadro 7 y Figura 28) y otro ajuste con las velocidades específicas estimadas con la ecuación 14 (Cuadro 8 y Figura 29). De acuerdo al ajuste realizado con los datos obtenidos de la ecuación 13 el valor de $\mu_{\text{máx}}$ es de 0.028 h^{-1} y para K_S el valor es de 6.72 g/L , mientras que el ajuste hecho a partir de la ecuación 14 proporciona un valor de $\mu_{\text{máx}}$ igual a 0.024 h^{-1} y un valor de K_S igual a 6.68 g/L .

Es importante mencionar que la razón de haber calculado las velocidades específicas usando dos ecuaciones diferentes es debido a que la ecuación 11 asume que la formación de biomasa depende de la velocidad de crecimiento, sin embargo esta ecuación no logró un buen ajuste de los datos experimentales obtenidos en la presente investigación. Por consiguiente se buscó una ecuación que lograra un mejor ajuste de los datos (Ver sección 6.6.2) y se encontró que la formación de biomasa fue constante durante las primeras 20 h. Para ambos casos los valores estimados de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S resultaron muy similares.

Cuadro 7. Valores estimados de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S mediante el ajuste no lineal realizado a partir de la ecuación 13.

Parámetro	Estimación	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
$\mu_{\text{máx}}$	0.0285	0.0024	0.0240	0.0349
K_S	6.7299	3.2339	0.9107	15.7255

Cuadro 8. Valores estimados de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S mediante el ajuste no lineal realizado a partir de la ecuación 14.

Parámetro	Estimación	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
$\mu_{\text{máx}}$	0.0247	0.0015	0.0216	0.0287
K_S	6.6866	2.4345	2.0245	13.1832

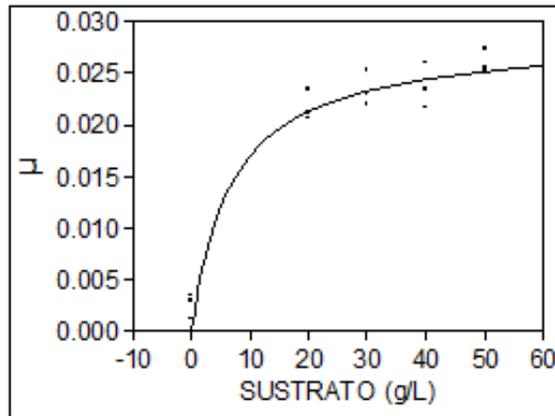


Figura 28. Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod con las velocidades específicas obtenidas a partir de la ecuación 13.

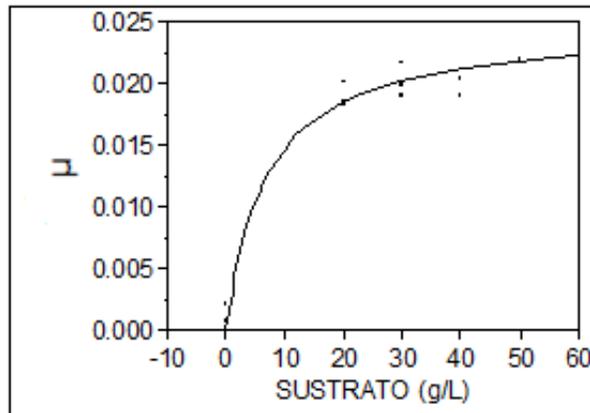


Figura 29. Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod con las velocidades específicas obtenidas a partir de la ecuación 14.

De acuerdo al ajuste no lineal realizado de la ecuación de Monod a partir de la ecuación 13 se puede concluir que con un sustrato no mayor a 15 g/L la reacción alcanza un medio de la velocidad inicial máxima. Esto quiere decir que aproximadamente a partir de 30 g/L se tendría la velocidad máxima, lo anterior se puede apreciar en la Figura 28. Por otra parte, de acuerdo al ajuste de Monod efectuado a partir de la ecuación 14, se puede decir que con un sustrato no mayor a 10 g/L la reacción alcanza un medio de la velocidad máxima, lo que significa que

aproximadamente a partir de los 20 g/L de sustrato se logra la velocidad máxima (Figura 29).

Los valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtenidos en el presente trabajo son similares a los valores reportados por *Kumar et al.* (1996) e Idris y Suzana (2006) (Ver Cuadro 9). Para la constante de Monod (K_S) se han reportado un amplio rango de valores (Cuadro 9). Los valores de K_S estimados en esta investigación (6.72 g/L y 6.68 g/L) son mayores a lo reportado previamente para *Lb. casei* (Altiok *et al.*, 2006), sin embargo, son similares a lo reportado por Idris y Suzana (2006). Por otra parte, se han reportado valores muy grandes (44.4 g/L) para otras especies de *Lactobacillus* (Fu y Mathews, 1999).

Los valores de $\mu_{\text{máx}}$ y K_S dependen de diferentes factores como son: el microorganismo, el nutriente limitante de crecimiento, el medio de fermentación y de los factores ambientales tales como pH y temperatura (Altiok *et al.*, 2006). Por lo anterior se especula que el hecho de haber estimado valores de K_S altos en comparación a los reportados por Altiok *et al.* (2006) se atribuye a diferencias en las condiciones de fermentación, como son el valor de pH al cual se llevó a cabo la fermentación y la forma de controlar el pH en el medio de fermentación. Fu y Mathews (1999) reportan que a pesar de un obtener un valor de K_S muy alto, lograron un buen ajuste de sus datos a la ecuación de Monod, este hecho coincide con nuestros resultados, en donde también se logró un buen ajuste de la ecuación de Monod aunque los valores de K_S obtenidos son un poco altos en comparación con lo reportado previamente para *Lb. casei* (Figura 30).

Cuadro 9. Parámetros cinéticos reportados en distintos trabajos.

Referencia	Microorganismo	Sustrato	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$K_s (\text{g/L})$
Altiok <i>et al.</i> (2006)	<i>Lb. casei</i>	Suero lácteo	0.265	0.72
Tango y Ghaly (1999)	<i>Lb. helveticus</i>	Suero lácteo	0.25	0.90
Fu y Mathews (1999)	<i>Lb. plantarum</i>	Lactosa	0.364	44.4
Kumar <i>et al.</i> (1996)	<i>Lb. delbrueckii</i>	Glucosa	0.0696	0.0967
Idris y Suzana (2006)	<i>Lb. delbrueckii</i>	Residuo líquido de piña	0.0903	9.26
En el presente trabajo	<i>Lb. casei</i>	Suero lácteo	0.024	6.68

6.6.2 Modelación matemática de la formación de biomasa, del producto y del consumo de sustrato

Para llevar a cabo la modelación matemática en primer lugar se decidió aplicar el modelo reportado previamente por Altiok *et al.* (2006) debido a que las características de su estudio son similares a las del presente trabajo, a diferencia de otros modelos también reportados previamente para la producción de ácido láctico como el de Tango y Ghaly (1999) quienes consideran un periodo de tiempo más largo en el proceso fermentativo, lo que permite observar fenómenos adicionales en el proceso de fermentación como la inhibición y descenso del crecimiento microbiano, los cuales no son aplicables al presente estudio porque el periodo de tiempo considerado para nuestra fermentación es menor.

Por ello la formación de biomasa representada en la ecuación 9 propuesta por Altiok *et al.* (2006) fue aplicable a nuestros datos dado que los coeficientes de poder tóxico tanto para inhibición por producto como para biomasa, h y f , respectivamente, no tienen sentido en nuestros datos experimentales porque la velocidad de formación de biomasa es prácticamente constante hasta las 20 h, en este periodo de tiempo no se observa ningún tipo de inhibición (Figura 30).

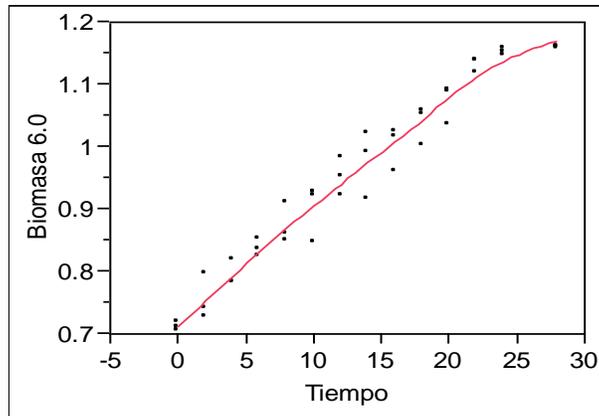


Figura 30. Perfil de la formación de biomasa a través del tiempo para la condición de pH controlado a 6.0.

Para el consumo de sustrato y formación de producto, las ecuaciones propuestas por Altiok *et al.* (2006) tampoco fueron adecuadas para los datos experimentales obtenidos en este trabajo (Figuras 31 y 32). Los datos experimentales para el consumo de sustrato y formación de producto obtenidos en la presente investigación muestran un comportamiento diferente al reportado previamente por Altiok *et al.* (2006). En nuestro caso, el sustrato comienza a disminuir inmediatamente que inicia la fermentación, de las 5 h a las 10 h el consumo es muy lento, transcurrido este tiempo el sustrato reinicia a descender de manera lineal aproximadamente hasta las 20 h y después el consumo de sustrato se detiene. La producción de ácido láctico es muy lenta durante las primeras 12 h, transcurrido este tiempo la producción se incrementa de forma considerable hasta alrededor de las 20 h, punto en el que la generación de ácido láctico comienza a detenerse. Por lo anterior, se decidió formular otra serie de ecuaciones, en base al comportamiento observado en nuestros datos experimentales.

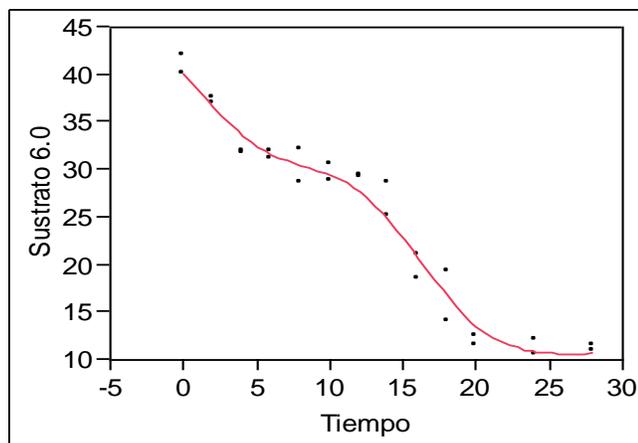


Figura 31. Perfil del consumo de sustrato a través del tiempo para la condición de pH controlado a 6.0.

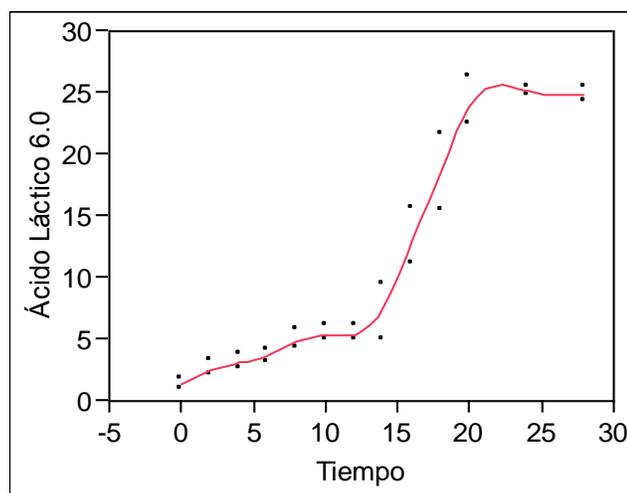


Figura 32. Perfil de la producción de ácido láctico a través del tiempo para la condición de pH controlado a 6.0.

Para la modelación de los datos experimentales, se tomaron en cuenta los datos obtenidos para la fermentación a un pH de 6.0 dado que fue la mejor condición lograda.

Para la formación de biomasa, debido a que se observó que el crecimiento de biomasa tiene una velocidad de crecimiento prácticamente constante durante las primeras 20 h se decidió aplicar un ajuste lineal a los datos (Figura 33) dentro de este periodo de tiempo, el cual si fue estadísticamente significativo (Anexo C). De esta forma el análisis del ajuste lineal (Anexo C) dio como resultado la ecuación 17, es decir que la derivada de la formación biomasa es igual a una constante (Ecuación 18).

$$x = 0.7190 + 0.018t \quad (17)$$

$$\frac{dx}{dt} = 0.018 \quad (18)$$

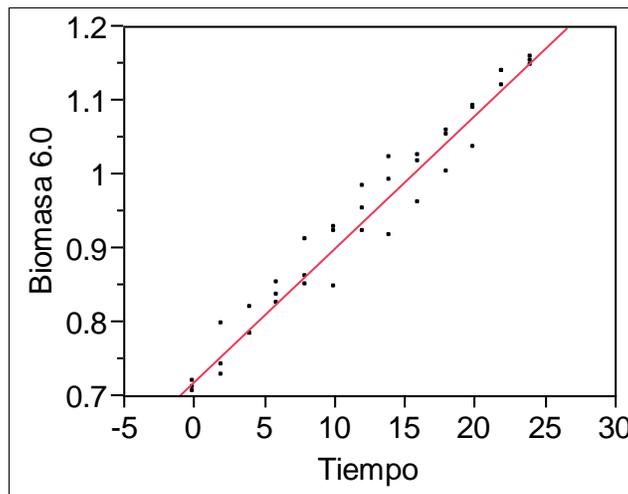


Figura 33. Ajuste lineal de los datos experimentales relativos a la formación de biomasa.

Con respecto a la formación de producto se decidió estudiar cómo la formación de producto es afectada con respecto a la biomasa, para la cual se aplicó una regresión polinomial; se logró un buen ajuste aplicando un polinomio cuadrático de los datos (Figura 34), de acuerdo al análisis estadístico el modelo sí es significativo (Anexo C). El ajuste polinomial aportó como resultado la ecuación 19. La derivación de la ecuación 19 resulta en la ecuación diferencial 23.

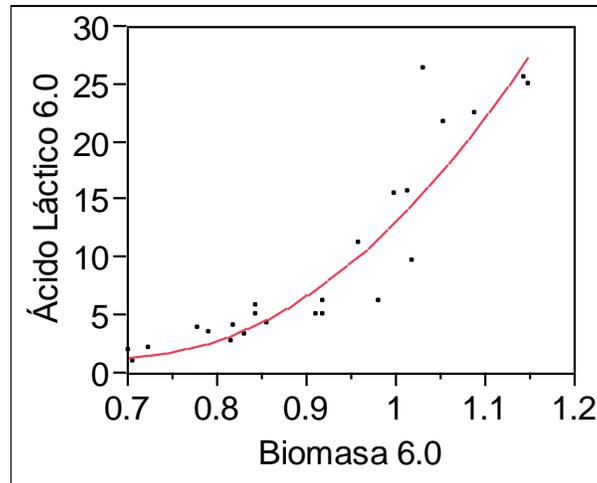


Figura 34. Ajuste polinomial de los datos experimentales para la formación de ácido láctico con respecto a la biomasa.

$$P = -43.12 + 55.26x + 128.17 (x - 0.9136)^2 \quad (19)$$

$$\frac{dP}{dt} = 55.26 \frac{dX}{dt} + 2(128.17)(X - 0.9136) \frac{dX}{dt} \quad (20)$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.99468 + 4.614(X - 0.9136) \quad (21)$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.99648 + 4.61X - (4.61)(0.9136) \quad (22)$$

$$\frac{dP}{dt} = -3.22 + 4.61X \quad (23)$$

El consumo de sustrato se estudió con respecto a la formación de producto y de biomasa; como resultado se obtuvo el polinomio 24, a partir del cual se logró la ecuación diferencial 28.

$$S = 53.76 - 0.91P + 0.02(P - 9.52)^2 - 22.13X \quad (24)$$

$$\frac{dS}{dt} = -0.91 \frac{dP}{dt} + 0.04(P - 9.52) \frac{dP}{dt} - 22.13 \frac{dX}{dt} \quad (25)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} (-0.91 + 0.04 (P - 9.52)) - 0.39 \quad (26)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} (0.04P + 1.29) - 0.39 \quad (27)$$

$$\frac{dS}{dt} = 1.34X - 0.13P + 0.18XP + 4.9 \quad (28)$$

La ecuación 28 señala que el sustrato depende de la biomasa (X) de una forma lineal, al igual que el producto (P), así también declara que hay una interacción de la biomasa y el producto, la cual crea una función compleja, este comportamiento complejo se puede observar en la Figura 35.

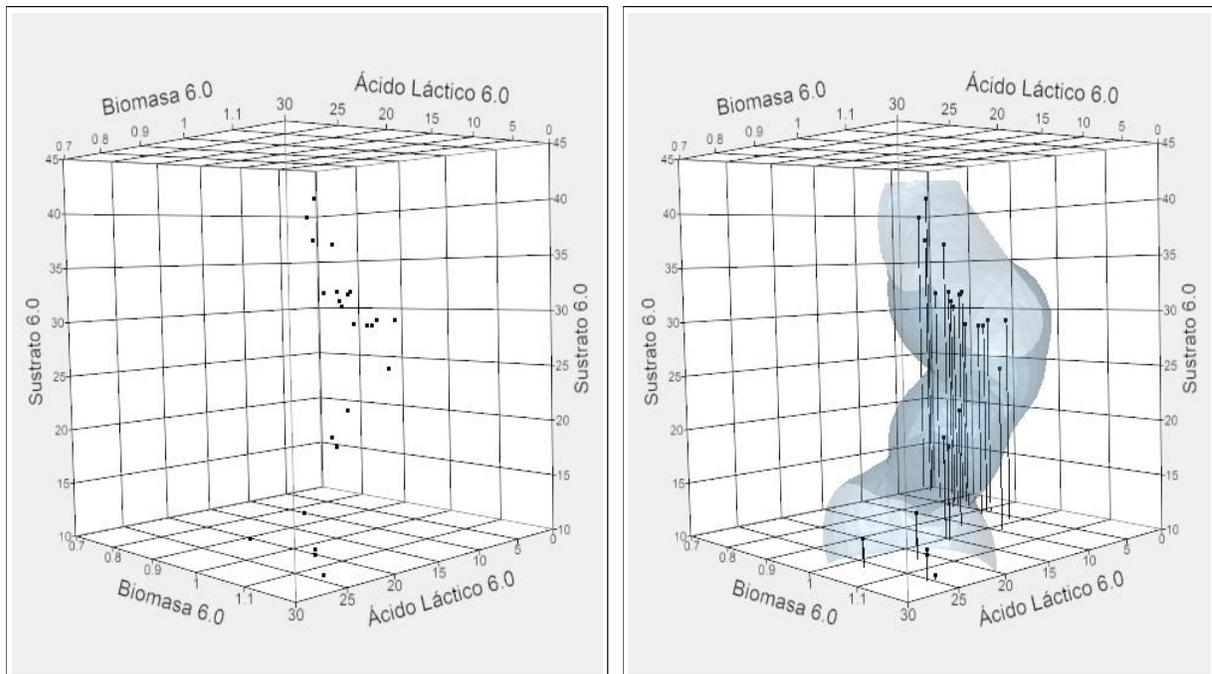


Figura 35. Comportamiento tridimensional de la formación de biomasa y producto con respecto al consumo de sustrato.

7. CONCLUSIONES

El suero lácteo suplementado mostró ser un buen sustrato para el crecimiento de *Lb. casei* y para la obtención de ácido láctico por fermentación. Asimismo, el suero lácteo empleado como sustrato en bioprocesos constituye una alternativa para su aprovechamiento como subproducto industrial y de esta manera disminuir la contaminación que se genera cuando es drenado sin algún tratamiento previo por parte de las industrias queseras.

Es necesario mantener un control del pH óptimo para la bacteria durante el proceso de fermentación en la producción de ácido láctico para lograr altos rendimientos de producto.

Para llevar a cabo la separación de ácido láctico es factible el uso de la tecnología de membranas de nanofiltración, las cuales pueden servir como una etapa de separación, concentración y purificación de compuestos, no obstante es necesario la aplicación de procesos adicionales para la obtención de un compuesto con alta pureza.

En la selección de una membrana de nanofiltración, además del tamaño de poro se deben considerar otras características como son: el tipo de material con que está fabricada la membrana, su afinidad por el compuesto a separar, la carga o neutralidad de los compuestos a separar y la hidrofiliidad e hidrofobicidad tanto de la membrana como de los compuestos a separar.

El modelo matemático reportado previamente por Altiok *et al.* (2006) no fue adecuado para modelar la formación de biomasa, el consumo de sustrato y la formación de producto en nuestros datos.

La aplicación de regresiones por polinomios en base al comportamiento observado en los datos experimentales mostró tener un ajuste adecuado de los datos. De la misma manera, es factible estudiar ecuaciones diferenciales con funciones más complejas que logren una buena modelación de los datos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre-Ezkauriatza, E.J., Aguilar-Yañez, J. M., Ramírez-Medrano A. y Alvarez M.M. 2010. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*. 101:2837-2844.
- Alford, J. S. 2006. Bioprocess control: Advances and challenges. *Computers & Chemical Engineering*. 30:1464-1475.
- Alonso, S., Herrero, M., Rendueles, M., y Díaz M. 2010. Residual yogurt whey for lactic acid production. *Biomass and Bioenergy*. 34:931-938.
- Altiok, D., Tokatli, F. y Harsa S. 2006. Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81:1190-1197.
- Álvarez, M.M., Aguirre-Ezkauriatza, J., Ramírez-Medrano, A. y Rodríguez-Sánchez, A. 2010. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *Journal of Dairy Science*. 93:5552-5560.
- Anjana, N. D. y Kumar, S. 2008. Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biochemical Engineering Journal*. 38:277-284.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Capítulo 1 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, S., Wright A. y Oumehand. Ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Balley, H. W., Martínez, F.J., Markee, C. y Eddleman, R.T. 2002. The ABCs of filtration and bioprocessing for the third millennium. Spectrum Laboratories, Inc.
- Benítez F. J., Acero, J. L., Real, F. J., Roldán, G. Rodríguez, E. 2011. Ultrafiltration and nanofiltration membranes applied to the removal of the pharmaceuticals amoxicillin, naproxen, metoprolol and phenacetin from water. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*. Disponible en: www.wileyonlibrary.com
- Berk, Z. 2009. *Food process engineering and technology*. Elsevier Inc. Disponible en www.elsevier.com
- Blanchard, P., Devaney, R.L. y Hall G. 2006. *Differential equations*. University of Boston.

- Böddeker, K. W. 2008. Liquid separations with membranes. An introduction to Barrier Interference. Springer.
- Bouchoux, A. y Roux-de Balmann, H., Lutin F. 2005. Nanofiltration of glucose and sodium lactate solutions. Variations of retention between single and mixed solute solutions. *Journal of membrane science*. 258:123-132.
- Boussu, K., Vandecasteele, C. y Van der Bruggen, B. 2008. Relation between membrane characteristics and performance in nanofiltration. *Journal of Membrane Science*. 320: 51-65.
- Büyükkileci, A. O. y Harsa, S. 2004. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei*. (NRRL B-44). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.79: 1036-1040.
- Chen, J.P., Mou, H., Wang, L.K. y Matsuura, T. 2009. Membrane filtration. Capítulo 7 en *Handbook of Environmental Engineering, Volume 4: Advanced Physicochemical Treatment Processes*. Wang L.K., Hung Y.S. y Shammass N.S. The Human Press Inc., Totowa, NJ.
- Cuartas-Uribe, B., Alcaina-Miranda, M. I., Soriano-Costa, E. y Bes-Piá, A. 2007. Comparison of the behavior of two nanofiltration membranes for sweet whey demineralization. *Journal of Dairy Science*. 90: 1094-1101.
- Datta, R. y Henry, M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies- a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81:1119-1129.
- Ding, S. y Tan, T. 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*. 41:1451-1454.
- Diosady, L. L. y Puzanov, T. 2005. Membrane fermentation of lactic acid. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 3:19-25.
- Doran, P. M. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Ed. Academic Press Limited.
- Kumar, D. S, Mukherjee, A. y Chakraborty, P. 1996. Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling. *Applied Microbiology Biotechnology*. 46:410-413.
- Fajardo, P. B., Rodríguez, I. A., Pastrana, L. C. y Pérez, N. G. 2008. Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 4043 in whey. *International Dairy Journal*. 18:1057-1065.
- Fitzpatrick, J. J., Ahrens, M. y Smith, S. 2001. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochemistry*. 36: 671-675.

- Fontes, L. C., Bolner, C. J., Piassi, M. B., Michelana, G. A. y Contiero, J. 2010. Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 1944-1950.
- Fu, W. y Mathews, A. P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*. 3:163-170.
- Ghaly, A. E. y Kamal, M.A. 2004. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*. 38:631-644.
- Giorno, L., Chojnacka, K., Donato, L. y Drioli, E. 2002. Study of a cell-recycle membrane fermentor for the production of lactic acid by *Lactobacillus bulgaricus*. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 41:433-440.
- González-Siso, M. I. 1996. The biotechnology utilization of cheese whey: A review: *Bioresource Technology*, 57:1-17.
- González, M. I., Álvarez, S., Riera F. y Álvarez, R. 2007. Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*. 80: 553-561.
- González, M. I., Álvarez, S., Riera F. A. y Álvarez, R. 2008 Lactic acid recovery from whey ultrafiltrate broths and artificial solutions by nanofiltration. *Desalination*. 228:84-96.
- Goulas, A. K., Kapasakalidis P. G., Sinclair, H. R., Rastall, R. A. y Grandison, A. S. 2002. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. *Journal of Membrane Science*. 209: 321-335.
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A. y Domingues, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts a part de integrated solutions for valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*. 28:375-384.
- He, Y., Li, G.M., Wang, H., Jiang, Z.W., Zhao, J.F., Su, H. X. y Huang, Q.Y. 2009. Experimental study on the rejection of salt and dye with cellulose acetate nanofiltration membrane. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 40. 289-295.
- Hetényi, K., Németh, A. y Sevela, B. 2011. Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*.

- Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal, K. 1997. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme Microbiology Technology*. 20:301-307.
- Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26:87-107
- Hujanen, M., y Linko, Y.Y.1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45:307-313.
- Idris, A. y Suzana, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperatura on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41:1117-1123.
- Jelen, P. 2003. Whey Processing. *Encyclopedia of Dairy sciences*. London: Academic Press. 4:2739-2751.
- Jin, B., Yin, P., Ma, Y. y Zhao, L. 2005. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32:678-686.
- Kashket, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance, *FEMS Microbiology Reviews* 46:233-244.
- Larpent, J. P. 1995. Las bacterias lácticas. *Microbiología Alimentaria. The food fermentations*. 2: 3-17.
- Lee, E. K. y Koros, W. J. 2004. Membranes, synthetic, applications. *Encyclopedia of Physical Science*. Third Edition, Volume 9. Ed. Academic Press.
- Li, Y. y Shahbazi. 2006. Lactic acid recovery from cheese whey fermentation broth using combined ultrafiltration and nanofiltration membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129-132: 985-996.
- Li, Y., Shahbazi, A., Coulibary, S. y Mims, M. M. 2007. Semicontinuos production of lactic acid from cheese whey using integrated membrane reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.136-140:897-908.
- Li, Y., Shahbazi, A., Williams, K. y Wan, C. 2008. Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 147: 1-9.
- Li, Z., Han, L., Ji, Y., Wang X y Tan, T. 2010. Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. *Biochemical Engineering Journal*. 49:138-142.

- Limsowtin, G. K. Y., Broome, M. C. y Powell I.B. 2002. Lactic acid bacteria, taxonomy. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1470-1478.
- Litchfield, J. H. 2009. Lactic acid, microbially produced. *Encyclopedia of Microbiology*. 362-372.
- Liu, B., Yang, M., Qi, B., Chen, X., Su, Z. y Wan, Y. 2010. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As. 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochemical Engineering Journal*. 52:212-219.
- Macauley-Patrick, S. y Finn B. 2008. Modes of fermenter operation. Capítulo 4 en *Practical Fermentation Technology*. McNeil, B. y Harvey, L.M. John Wiley & Sons, Ltd.
- Madigan, M. T., Martinko J. M. y Parker, J. 2004. Brock: Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. 10ª Edición.
- Mattews, G. 2008. Fermentation equipment selection: laboratory scale bioreactor desing considerations. Capítulo 2 en *Practical Fermentation Technology*. McNeil, B. y Harvey, L.M. John Wiley & Sons, Ltd.
- Mäyrä-Mäkinen, A. y Bigret M. 2004. Industrial use and production of lactic acid bacteria. Capítulo 5 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, S., Wright A. and Oumehand. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- McNeil, B. y Harvey L. M. 2008. Fermentation: An art from the past, a skill for the future. Capítulo 1 en *Practical Fermentation Technology*. McNeil, B. y Harvey, L.M. John Wiley & Sons, Ltd.
- Milcent, S. y Carrere, H. 2001. Clarification of lactic acid fermentation broths. *Separation and Purification Technology*. 23:393-401.
- Moueddeb, H., Sánchez, J. Bardot, C. y Fick, M. 1996. Membrane bioreactor for lactic acid production. *Journal of Membrane Science*. 114: 59-71.
- Mondragón-Parada, M. E., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C., Galíndez-Mayer, J. y Cristiani-Urbina, E. 2006. Lactic acid bacteria production from whey. *Applied Biocehmistry Biotechnology*. 74:35-42.
- Monteagudo, J. M., Rodríguez, L., Rincón J. y Fuertes J. 1997. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacills delbrueckii* grown on beet molasses. *Journal of Chemistry Technology Biotechnology*. 68:271-276.

- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., y Roberto I. C. 2008. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochemical Engineering Journal*. 40:437-444.
- Nancib, A., Nancib, N. y Boudrant J. 2009. Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 25:1423-1429.
- Narayanan, N., Roychoudhry, P. K. y Aradhana, S. A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymeratization. *Microbiology Biotechnology*. 7: 1-15.
- Nousiainen, J., Javanainen, P., Setälä J y Wright, A.V. 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics. Capítulo 20 en *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Salminen, S., Wright A. and Oumehand. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Pal, P., Sikder, J., Roy, S. y Giorno, L. 2009. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based process. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 48:1549-1559.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. y Bunko, K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105: 1-14.
- Pereira, A. L., Maciel, T. C. y Rodrigues S. 2010. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. Disponible en: www.sciencedirect.com.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F. y Font, G. V. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 141:73-81.
- Polom, E. y Szaniawska, D. 2006. Rejection of lactic acid solutions by dynamically formed nanofiltration membranes using a statistical desing method. *Desalination*. 198:208-214.
- Pontalier, P. Y., Ismail, A. y Ghoul, M. 1997. Mechanisms for the selective rejection of solutes in nanofiltration membranes. *Separation and Purification Technology*. 12:175-181.
- Qin, J., Wang, X., Zheng, Z., Ma, C., Tang, H. y Xu, P. 2010. Production of L-lactic acid by thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. *Bioresource Technology*. 101:7570-7576.
- Rojan, J. P., Nampoothiri, M. K. y Pandey, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*. 74:524-534.

- Rojan, J. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, M. K. y Pandey, A. 2009. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*. 27:145-152.
- Rodríguez, A. C., Cabrera, L. A. I. y Valencia, F. J. I. 2003. Diseño y construcción de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 24:55-70
- Ruíz-Leza, H. A., Rodríguez, J. R. M., Rodríguez, H. R., Contreras, E. J. C. y Aguilar C. N. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación sólida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6:33-40.
- Sastre, A. M., Pabby, A. K. y Rizvi, S. S. 2009. *Handbook of Membrane Separations. Chemical, Pharmaceutical, Food and Biotechnology Applications*. CRC Press.
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M. y Shahi, V. K. 2009. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*. 145:1-22.
- Serna, C. L. y Rodríguez, S. A. 2005. Producción Biotecnológica de Ácido Láctico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5:54-65.
- Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP). 2008. *Boletín de Leche*, pp. 17-19.
- Schepers, A. W., Thibault, J. y Lacroix, C. 2006. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:324-337.
- Shahbazi, A., Mims, M. R., Li, Y., Shirley, V., Ibrahim, S. A. y Morris, A. 2005. Lactic acid production from cheese whey by immobilized bacteria. *Applied Biochemistry and Technology*. 121-124:529-540.
- Sun, X., Wang, Q., Zhao, W., Ma, H. y Sakata, K. 2006. Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method. *Separation and Purification Technology*. 49:43-48.
- Tong, W.Y., Fu, X.Y., Lee, S.M., Yu, J., Liu J.W., Wei, D.Z y Koo Y.M. 2004. Purification of L (+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA.92. *Biochemical Engineering Journal* 18:89-96
- Urribarí, L., Vielma, A., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z. y Ramones, E. 2004. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica Universidad Zulia*. 14:297-309.

- Walstra, P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T. J. 2006. Dairy science and technology. Ed. Taylor & Francis Group.
- Wang, X. L., Shang, W. J., Wang, D. X., Wu, L. y Tu, C.H. 2009. Characterization and applications of nanofiltration membranes: State of the art. *Desalination*. 236:316-326.
- Weng, Y. H., Wei, H. J., Tsai, T. T., Y., Chen, W. H., Wei, T. Y., Hwang, W. S., Wang, C. P. y Huang C. P. 2009. Separation of acetic acid from xylose by nanofiltration. *Separation and Purification*. 67:95-102.
- Xu, Z., Wang, Q., Wang P., Cheng G., Ji, Y. y Jiang, Z. 2007. Production of lactic acid from soybean stalk hydrolysate with *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*. 42:89-92.
- Yoo, I., Chang, H., Lee E., Chang Y. y Moon, S. 1996. Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6: 482-486.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E. y Hang, Y. D. 2004. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology*. 42:315-318.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E. y Hang Y. D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technology*. 38:73-75.
- Yu, S., Liu, M., Ma, M., Qi, M., Lü, Z. y Gao, C. 2010. Impacts of membrane properties on reactive dye removal from dye/salt mixtures by asymmetric cellulose acetate and composite polyamide nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. 350: 83-91.
- Young-Jung, W. y Ryu, H. W. 2009. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. *Bioresource Technology*. 100:4262-4270.
- Zhang, Z. Y., Jin, B. y Kelly J.M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*. 35:251-263.

ANEXO A

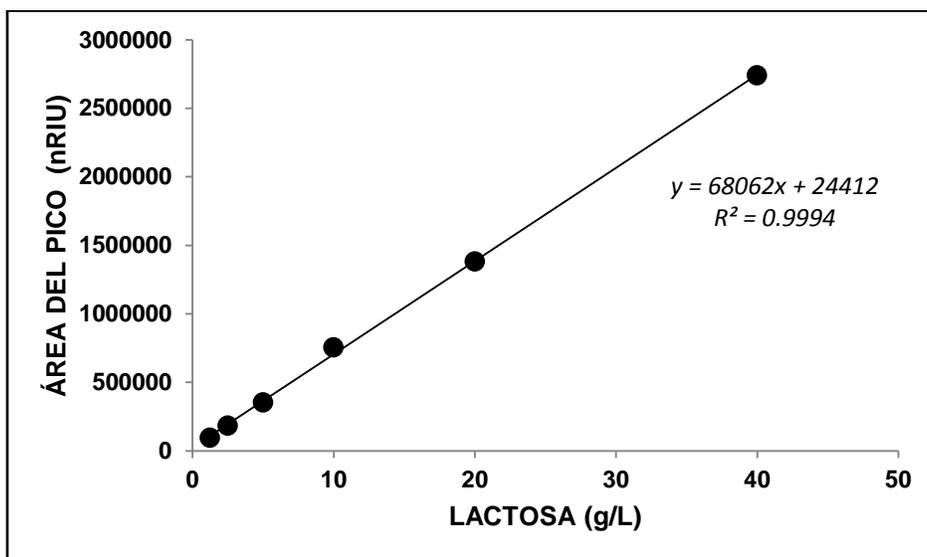


Figura A.1. Curva de calibración para determinar concentración de lactosa.

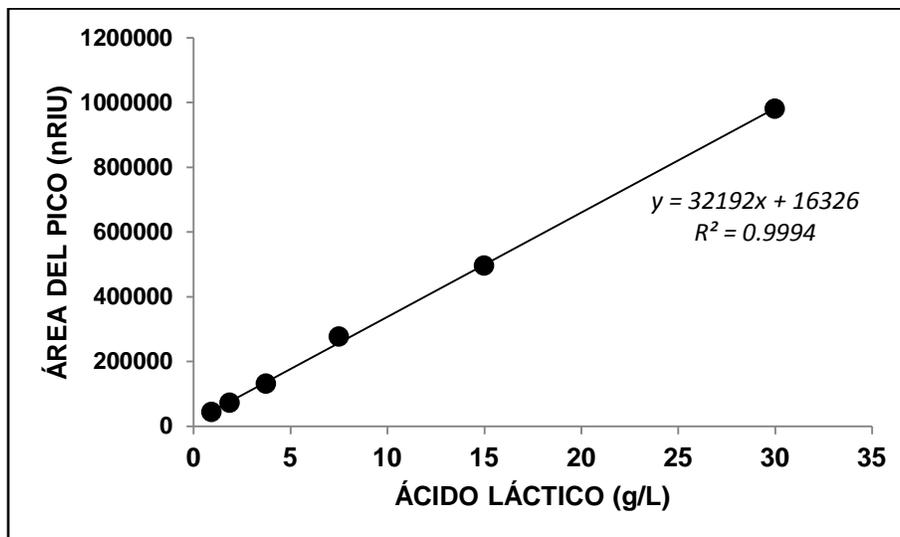


Figura A.2. Curva de calibración para determinar concentración de ácido láctico.

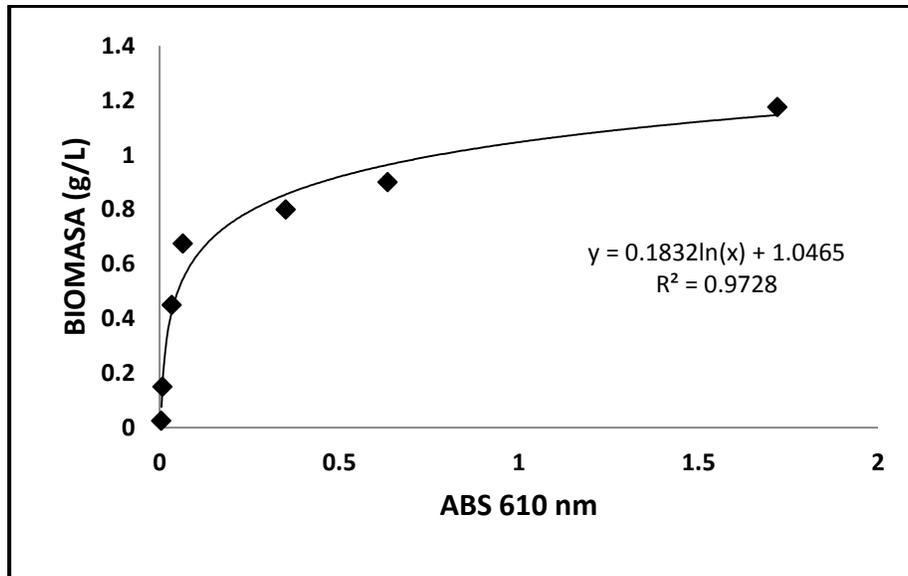


Figura A.3. Curva de calibración para determinar concentración de biomasa.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO (EXPERIMENTOS)

Crecimiento microbiano en suero lácteo (Análisis estadístico asociado a las Figuras 12 y 13)

Sustrato (g/L)	% Inóculo	Fase	Log (UFC/ml) al inicio	Log (UFC/ml) después de 20 h	Log (UFC/mL) ganados a las 20 h
20	1	E	7.54	9.27	1.73
30	1	E	7.48	9.38	1.9
40	1	E	7.49	9.39	1.9
50	1	E	7.44	9.42	1.98
20	5	E	8.10	9.17	1.07
30	5	E	8.10	9.24	1.14
40	5	E	8.04	9.28	1.24
50	5	E	8.05	9.33	1.28
20	10	E	8.55	9.26	0.71
30	10	E	8.47	9.28	0.81
40	10	E	8.48	9.44	0.96
50	10	E	8.37	9.34	0.97
20	20	E	8.72	9.36	0.64
30	20	E	8.66	9.38	0.72
40	20	E	8.75	9.43	0.68
50	20	E	8.6	9.47	0.87
20	1	L	7.08	9.09	2.01
30	1	L	6.98	9.11	2.13
40	1	L	6.99	9.33	2.34
50	1	L	7.07	9.30	2.23
20	5	L	7.88	8.99	1.11
30	5	L	7.80	9.17	1.37
40	5	L	7.79	8.75	0.96
50	5	L	7.88	8.95	1.07
20	10	L	8.00	9.36	1.36
30	10	L	7.83	9.32	1.49
40	10	L	7.80	9.52	1.72
50	10	L	7.80	9.43	1.63
20	20	L	8.51	9.47	0.96
30	20	L	8.48	9.49	1.01
40	20	L	8.36	9.58	1.22
50	20	L	8.41	9.74	1.33

*Los datos son el promedio de tres réplicas.

Respuesta: Logaritmos ganados a las 20 h

Análisis of Varianza

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la Media	F Ratio
Model	22	7.3436250	0.333801	26.4542
Error	9	0.1135625	0.012618	Prob > F
C. Total	31	7.4571875		<.0001

Prueba de Efectos

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	F Ratio	Prob > F
Sustrato	3	0.2212625	5.8451	0.0169
Inóculo	3	5.5475625	146.5509	<.0001
Fase	1	0.8911125	70.6220	<.0001
Inóculo*Sustrato	9	0.1122625	0.9886	0.5067
Sustrato*Fase	3	0.0071625	0.1892	0.9011
Fase*Inóculo	3	0.5642625	14.9062	0.0008

Prueba de Tukey

Sustrato (g/L)

Alfa= 0.050

Nivel		Media CM
50	A	1.4200000
40	A	1.3775000
30	A B	1.3212500
20	B	1.1987500

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

Inoculo (%)

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
1	A	2.0275000
10	B	1.2062500
5	B	1.1550000
20	C	0.9287500

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

Fase

Alfa= 0.050

Nivel	Media CM
E	1.1625000
L	1.4962500

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

Inoculo (%)*Fase

Alfa=0.050

Nivel			Media CM
L,1	A		2.1775000
E,1	A		1.8775000
L,10		B	1.5500000
E,5		C	1.1825000
L,20		C D	1.1300000
L,5		C D	1.1275000
E,10		D E	0.8625000
E,20		E	0.7275000

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

Recuperación de ácido láctico y lactosa
(Prueba estadística asociada a las Figuras 20, 21, 22, 23, 24, 25)

RESPUESTA: Lactosa

Análisis de Varianza

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado media	F Ratio
Modelo	4	38301.820	9575.45	153.5658
Error	19	1184.728	62.35	Prob > F
C. Total	23	39486.548		<.0001

Prueba de Efectos

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	F Ratio	Prob > F
MEMBRANA	1	38071.107	610.5630	<.0001
PRESIÓN	1	176.475	2.8302	0.1089
TIEMPO	2	54.237	0.4349	0.6536

Prueba de Tukey

MEMBRANA

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
Acetato	A	83.773333
TFC-SR3	B	4.116667

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

PRESIÓN

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
300	A	46.656667
150	A	41.233333

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

TIEMPO

Alpha=0.050

Nivel		Media CM
20	A	45.747500
40	A	44.020000
5	A	42.067500

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

RESPUESTA: Ácido Láctico

Análisis de Varianza

Fuente	GL	Suma of Cuadrados	Cuadrado media	F Ratio
Modelo	4	1183.7449	295.936	21.5232
Error	19	261.2431	13.750	Prob > F
C. Total	23	1444.9880		<.0001

Prueba de Efectos

Fuente	GL	Suma of Cuadrados	F Ratio	Prob > F
MEMBRANA	1	1114.6614	81.0684	<.0001
PRESIÓN	1	2.0184	0.1468	0.7059
TIEMPO	2	67.0651	2.4388	0.1141

Prueba de Tukey

MEMBRANA

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
Acetato	A	88.700000
TFC-SR3	B	75.070000

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

PRESIÓN

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
300	A	82.175000
150	A	81.595000

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

TIEMPO

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
20	A	83.712500
40	A	82.270000
5	A	79.672500

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

Flujo de permeado

(Prueba estadística asociada a las Figura 26)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado media	F Ratio
Modelo	2	28.329800	14.1649	10.2263
Error	5	6.925750	1.3851	Prob > F
C. Total	7	35.255550		0.0171

Prueba de Efectos

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	F Ratio	Prob > F
Membrana	1	0.204800	0.1479	0.7164
Presión	1	28.125000	20.3047	0.0064

Prueba de Tukey

Membrana

Alfa=0.050

Nivel		Media CM
TFC-SR3	A	9.4225000
Acetato	A	9.1025000

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

Presión

Alfa=0.050

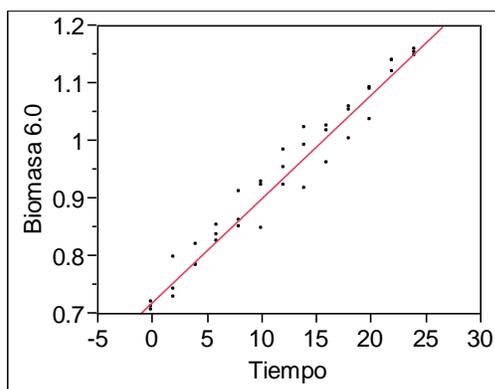
Nivel		Media CM
300	A	11.137500
150	B	7.387500

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes

ANEXO C

Ajuste lineal de la formación de biomasa

$$\text{Biomasa 6.0} = 0.7190407 + 0.0180594 * \text{Tiempo}$$



— Linear Fit

Resumen del ajuste

R cuadrada	0.9643
Raíz de la media del error cuadrado	0.0271
Media de la respuesta	0.9354
Observaciones	39

Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Ratio
Model	1	0.71229651	0.712297	950.07
Error	37	0.02771900	0.000749	Prob F
C. Total	38	0.74001552		<.0001

Parámetros estimados

Término	Estimado	Error Std	t Ratio	Prob> t
Intercepto	0.719047	0.00823	861	<.001
Tiempo	0.018054	0.00086	303	<.001

Respuesta ácido láctico con respecto a la biomasa

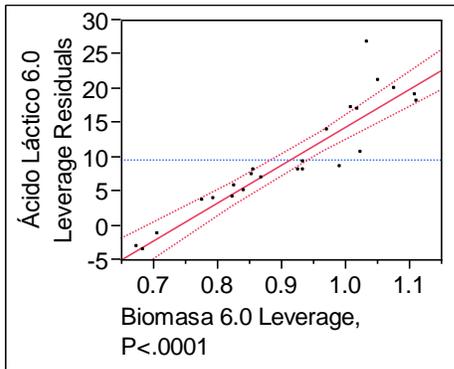
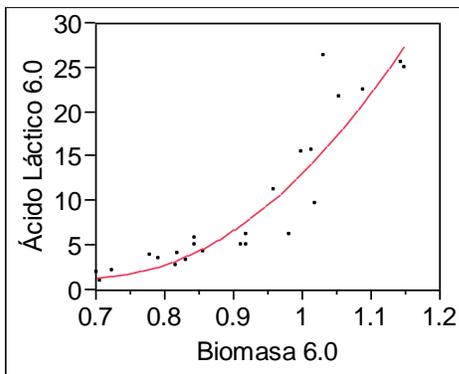


Gráfico de regresión



Resumen del ajuste

R Cuadrada	0.8699
Media de la raíz del error cuadrado	3.2722
Media de la respuesta	9.5117
Observaciones	24

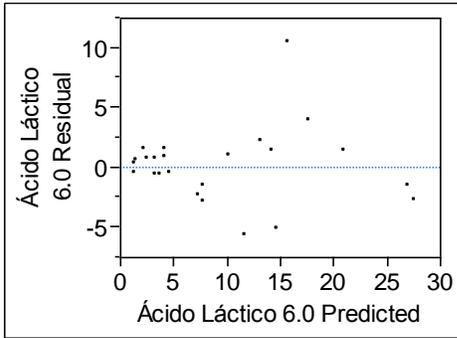
Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma of Cuadrados	Cuadrado medio	F Ratio
Modelo	2	1435.9981	717.999	66.871
Error	21	225.4613	10.736	Prob>F
C. Total	23	1661.4594		<.0001

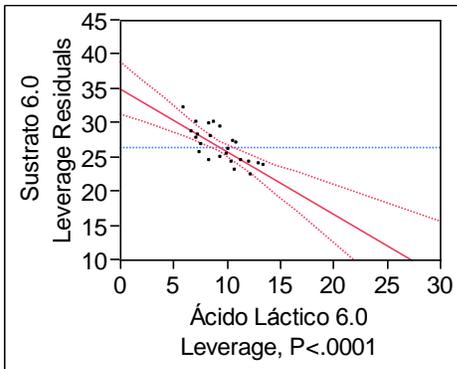
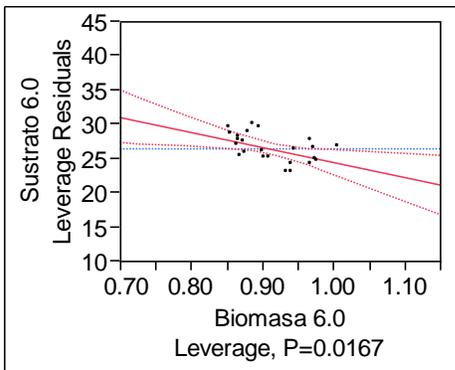
Parámetros estimados

Término	Estimado	Error std	Ratio	Prob> t
Intercepto	-43.12218	4.764516	-9.05	<.0001
Biomasa 6.0	55.263011	5.201147	0.63	<.0001
(Biomasa 6.0-0.91361)*(Biomasa 6.0-0.91361)	128.17341	39.54431	3.24	0.0039

Residuales



Respuesta sustrato con respecto a la biomasa y ácido láctico



Resumen del ajuste

R Cuadrado	0.9678
Media de la raíz del error cuadrado	1.8825
Media de la respuesta	26.333
Observaciones	24

Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F Ratio
Modelo	3	1956.8712	652.290	183.91
Error	20	71.0211	3.551	Prob >F
C. Total	23	2027.8923		<.0001

Parámetros estimados

Término	Estimado	Error std	t Ratio	Prob> t
Intercepto	53.766158	6.614778	8.13	<.0001
Ácido Láctico 6.0	-0.912724	0.187904	-4.86	<.0001
(Ácido Láctico 6.0-9.51792)*(Ácido Láctico 6.0-9.51792)	0.0210945	0.010778	1.96	0.0644
Biomasa 6.0	-22.12755	8.470908	-2.61	0.0167

Residuales

