



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

**FACULTAD DE QUÍMICA
POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE
LA REPUBLICA**

“Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

I.A. Adriana Arellano Arriaga

DIRIGIDA POR

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología en Alimentos

"EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN Y SEPARACIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE SUERO LÁCTEO MEDIANTE
TECNOLOGÍA DE MEMBRANA"

TESIS

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

Presenta:

I.A. Adriana Arellano Arriaga

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

SINODALES

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

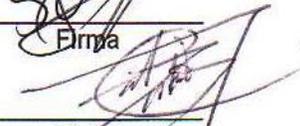
Dr. Carlos Regalado González
Vocal

Dra. Blanca García Almendárez
Suplente

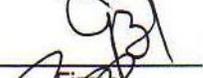
Dr. Lech Ozimek
Suplente

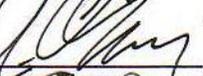

MSP. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2013
México

RESUMEN

El ácido láctico es un compuesto muy versátil y de amplias aplicaciones, actualmente es producido mayormente por fermentaciones de sustratos baratos (ej., suero lácteo) mediante el uso de bacterias ácido lácticas (ej., *Lactobacillus casei*) para así obtener isómeros específicos. Sin embargo, presenta baja productividad y costos de operación elevados, debido a los tratamientos necesarios para su recuperación y purificación. La tecnología de membranas de nanofiltración es una alternativa novedosa y ventajosa para separar, concentrar y purificar el ácido láctico, presentando bajos costos de operación. Por otro lado, el modelaje matemático de bioprocesos, es una herramienta útil que permite estudiar, predecir y optimizar dichos sistemas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el proceso de separación de ácido láctico mediante tecnología de membrana, así como caracterizar el proceso de obtención del mismo a partir de la fermentación de suero lácteo por *Lactobacillus casei* (ATCC334) y proponer un modelo matemático que se ajuste adecuadamente al sistema. Se evaluó, a nivel matraz, la suplementación del suero a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio y de manganeso; encontrando que la adición de 0.03 g/L de $MnSO_4$ tiene un efecto benéfico en la producción de ácido láctico, obteniendo una concentración de 25 g/L de ácido y 85% de consumo de sustrato, mientras que la adición de $MgSO_4$ no mostró diferencias significativas. Se observó que, la producción de ácido láctico tiene tres etapas características: 1) fase lag extendida 2) fase de alta producción de ácido láctico y consumo de sustrato a un tiempo t_c y 3) fase de inhibición de sustrato. Se aplicó un modelo matemático propuesto por Altioik en 2004 a los datos experimentales; sin embargo no logró un buen ajuste, por lo que fue necesario estudiar otros modelos basados en la ecuación logística para la formación de biomasa, los cuales tuvieron un buen ajuste a la formación de biomasa y consumo de sustrato pero no para la formación de producto, por lo que será necesario valorar posibles factores que estén afectando el sistema. Se probaron dos membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico (TFC-SR2 y TFC-SR3) y su funcionamiento fue evaluado mediante la recuperación de ácido láctico, la retención de lactosa y el flujo de permeado. La membrana TFC-SR2 mostró los mejores resultados en la separación de ácido láctico a una presión de 300 psig (2.068 MPa) a pH de 2.5 y 3.5, recuperando 95% del ácido láctico y reteniendo el 98% de la lactosa a los 20 minutos de nanofiltración. En general los resultados muestran que el suero lácteo es un sustrato adecuado para la producción de ácido láctico, y constituye una alternativa para disminuir contaminación generada al ser drenado. Además que la tecnología de nanofiltración puede ser usada para concentrar y/o purificar el ácido láctico.

(Palabras clave: ácido láctico, bacterias ácido lácticas, suero lácteo, tecnología de membrana, nanofiltración, modelaje matemático).

SUMMARY

Lactic acid is a very versatile compound and is used for many applications, actually is predominantly produced by fermentation of cheap substrate (eg. whey) by using lactic acid bacteria (eg. *Lactobacillus casei*) in order to obtain specific isomers. However it has low productivity and high operating costs due to the necessary treatments for recovery and purification. The nanofiltration membrane technology is a novel and advantageous alternative for the lactic acid separation, concentration and purification, featuring low operating costs. On the other hand, the mathematical modeling of bioprocesses, is a useful tool for studying, predict and optimize these systems. The aim of this study was to characterize the lactic acid production and separation by fermentation from milk whey by *Lactobacillus casei* (ATCC334) using membrane technology and propose a mathematical model that fits system properly. Whey supplementation was evaluated using different concentrations of magnesium and manganese sulphate it was found that the addition of 0.03 g/L $MnSO_4$ has a beneficial effect on lactic acid production, obtaining a lactic acid concentration of 25 g/L and 85% of substrate consumption while adding $MgSO_4$ showed no significant differences. It was observed that the production of lactic acid has three characteristic phases: 1) extended lag phase 2) high lactic acid production and substrate consumption to a time t_c phase and 3) substrate inhibition phase. A mathematical model proposed by Altiok *et al.*, (2004) was applied to the experimental data, but this model did not achieve a good fitting, hence, the study of additional models based of logistic equation by the biomass formation, this models have a good fitting for the biomass production and substrate consumption but not for forming product, making it necessary to evaluate possible factors that are affecting the system. Two nanofiltration membranes were tested for lactic acid separation (TFC-SR2 and TFC-SR3) and their performance was evaluated trough the lactic acid recovered, lactose rejection and flux permeate. The TFC-SR2 membrane showed the best results in the separation of lactic acid at a pressure of 300 psig (2.068 MPa) and at pH 2.5 and 3.5 recovering 95% of lactic acid and retaining 98% of the lactose at 20 minutes of the process. In general, results suggest that whey is a suitable substrate for the lactic acid production and it is an alternative for reducing pollution generated by drained. Besides nanofiltration technology can be used for lactic acid concentration and / or purification.

(Keywords: Lactic acid, lactic acid bacteria, milk whey membrane technology, mathematical modeling).

DEDICATORIAS

A mi Chuya, mi guía, mi luz, mi ángel...

A mi padre, porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo.

A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.

A mis familiares, viejos amigos y a quienes recién se sumaron a mi vida para hacerme compañía con sus sonrisas de ánimo. En especial a ti Hugo, porque a lo largo de este trabajo aprendimos que nuestras diferencias se convierten en riqueza cuando existe respeto, confianza y amor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que de una u otra forma estuvieron conmigo, porque cada una aportó con un granito de arena; y es por ello que a todos y a cada uno de ustedes les dedico todo el esfuerzo, sacrificio y tiempo que entregué a esta tesis.

A tí Dios mío, por darme la oportunidad de existir así, aquí y ahora; por mi vida. Gracias por iluminarme y darme fuerzas y caminar por tu sendero.

A ti Papi, por tu incondicional apoyo, por estar pendiente de mí a cada momento. Gracias papi por ser ejemplo de arduo trabajo y tenaz lucha en la vida.

A ti Mami, que tienes algo de Dios por la inmensidad de tu amor, y mucho de ángel por ser mi guarda y por tus incansables cuidados. Porque si hay alguien que está detrás de todo este trabajo, eres tú, que has sido, eres y serás el pilar de mi vida.

A ustedes Tote y Mocandraco, porque juntos aprendimos a vivir compartiendo triunfos y fracasos, alegrías y tristezas. Doy gracias a Dios porque somos hermanos.

A ti, Hugo amor de mi vida, que has sido fiel amigo y compañero, que me has ayudado a continuar, haciéndome vivir los mejores momentos de mi vida. Gracias a ti mi Apetosho por tu cariño y comprensión, porque sé que siempre contaré contigo a pesar de la distancia y los retos.

A mi hermosa familia, abuelitas, tíos, primos y sobrinos porque de una u otra forma, con su apoyo moral me han incentivado a seguir adelante, a lo largo de toda mi vida.

A todos, mis amigos y amigas que me han brindado desinteresadamente su valiosa amistad; gracias por ser la sal que condimenta mi vida. Especialmente a ustedes Anabel, Ana y Adriana, porque más que mis compañeras, se han convertido en mis amigas. Gracias por aceptarme como soy, por soportarme; porque juntas hemos hecho realidad este sueño.

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

Y por último y no menos importante, me gustaría agradecer sinceramente a mi comité, su conocimiento y orientación han sido fundamentales para la conclusión de este trabajo. A mi asesora la doctora Silvia y al doctor Castaño por sus valiosos consejos y la confianza depositada en mí, estoy en deuda por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado la maestría.

A todos ellos muchas gracias

Adriana Arellano Arriaga

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
1.INTRODUCCIÓN	1
2.REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Ácido láctico	3
2.1.1. Generalidades.....	3
2.1.2. Aplicaciones.....	4
2.1.3. Producción mundial.....	5
2.1.4. Procesos de producción.....	6
2.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)	7
2.2.1. Generalidades.....	7
2.2.2. Metabolismo de los azúcares.....	9
2.2.3. Características de <i>Lactobacillus casei</i>	13
2.2.4. Factores que afectan el crecimiento de <i>Lb. casei</i> y la eficiencia en la producción de ácido láctico.	14
2.2.4.1.Micronutrientes.....	14
2.2.4.2.Temperatura.....	15
2.2.4.3.pH	15
2.2.4.4.Tipo de fermentación	15
2.2.4.5.Fuente de nitrógeno	15
2.2.4.6.Fuente de carbono	16
2.3. Suero lácteo	16
2.3.1. Suero lácteo como contaminante: problemática actual.....	18
2.3.2. Aplicaciones del suero lácteo.....	19
2.4. Tecnología de membrana.....	20

2.4.1. Fundamentos de los sistemas de membrana	21
2.4.2. Clasificación de las membranas	22
2.4.3. Procesos de separación por medio de membranas	23
2.4.3.1. Microfiltración (MF)	23
2.4.3.2. Ultrafiltración (UF)	25
2.4.3.3. Osmosis inversa (OI) y Nanofiltración (NF)	25
2.4.4. Tipos de operación según el mecanismo de separación de membrana	26
2.4.5. Factores que afectan la separación en nanofiltración	27
2.4.5.1. Corte de peso molecular (MWCO), grado de desalinización y porosidad de la membrana	28
2.4.5.2. Peso molecular, tamaño y geometría del soluto	28
2.4.5.3. Carga del soluto y la membrana (Mecanismo de exclusión de Donnan)	29
2.4.5.4. Interacciones de adsorción entre la membrana y los solutos	31
2.4.6. Caracterización de membranas	31
2.5. Modelación matemática de bioprocesos	32
2.5.1. Modelos cinéticos de crecimiento microbiano y formación de producto	34
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo general	38
4.2. Objetivos específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Material biológico	39
5.1.1. Microorganismo	39
5.1.2. Medio de Cultivo	39
5.1.3. Preparación del inóculo	39
5.2. Métodos	40

5.2.1. Evaluación de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio como suplemento del medio de cultivo sobre el desarrollo de <i>Lb. casei</i>	40
5.2.2. Evaluación de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio como suplemento del medio de cultivo sobre el desarrollo de <i>Lb. casei</i> , producción de ácido láctico y consumo de sustrato.....	40
5.2.3. Producción de ácido láctico en fermentación tipo lote	41
5.2.4. Evaluación del funcionamiento de membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico del suero fermentado	42
5.3. Técnicas analíticas	44
5.3.1. Cuantificación de lactosa por el método de Dubois	44
5.3.2. Cuantificación de ácido láctico y lactosa.....	44
5.3.3. Determinación de biomasa	44
5.3.4. Determinación de cloruros, fosfatos y sulfatos del permeado.....	45
5.4. Desarrollo del modelo matemático	45
5.5. Diseño experimental y análisis estadístico	47
6.RESULTADOS	48
6.1. Evaluación del efecto de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio sobre el crecimiento de <i>Lb. casei</i>	48
6.2. Evaluación del efecto de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio sobre el crecimiento de <i>Lb. casei</i> , producción de ácido láctico y consumo de sustrato.	53
6.3. Análisis de las cinéticas de consumo de sustrato, formación de biomasa y producto bajo las condiciones de suplementación establecidas en un proceso tipo lote	59
6.4. Desarrollo del modelo matemático	63
6.4.1. Determinación de los parámetros cinéticos	63
6.4.2. Modelación matemática del consumo de sustrato y de la formación de biomasa y ácido láctico.....	67

6.5. Evaluación del efecto de las condiciones de operación del sistema de unidad de membrana para la separación del ácido láctico del caldo de fermentación por nanofiltración	75
6.5.1. Evaluación de las condiciones de operación del sistema sobre el flujo de permeado	75
6.5.2. Evaluación de las condiciones de operación del sistema sobre la retención de lactosa y la recuperación de ácido láctico.	78
7.CONCLUSIONES.....	85
8.BIBLIOGRAFÍA	87
9.ANEXOS	94
Anexo A: Medición de azúcares por el método de Dubois.....	94
Anexo B: Curvas de calibración de biomasa, lactosa y ácido láctico	96
B.1. Curva de calibración para determinar la concentración de biomasa	96
B.2. Curva de calibración para determinar la concentración de lactosa.....	96
B.3. Curva de calibración para determinar la concentración de ácido láctico.....	97
Anexo C: Medición de cloruros, fosfatos y sulfatos.....	98
C.1 Cloruros.....	98
C.2 Fosfatos.....	99
C.3 Sulfatos	100
ANEXO D: Análisis estadístico de experimentos	102
D.1. Crecimiento microbiano en suero lácteo	102
D.2. Separación de ácido láctico.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		pág.
1	Propiedades físico-químicas del ácido láctico	4
2	Composición típica del suero lácteo dulce y ácido	17
3	Contenido de vitaminas del suero lácteo	18
4	Concentraciones de sulfato de manganeso y magnesio al medio de cultivo a base de suero lácteo	41
5	Especificaciones de membranas de nanofiltración utilizadas para la separación de ácido láctico	43
6	Velocidad de crecimiento de <i>Lb. casei</i> en fase exponencial e incremento de biomasa a las 24 horas de fermentación en un medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de manganeso y magnesio	52
7	Características de la producción de ácido láctico mediante la fermentación de suero lácteo desproteínizado suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de manganeso y magnesio por <i>Lb. casei</i> a las 24 horas de fermentación	57
8	Productividad de ácido láctico y rendimiento de producción de ácido láctico y biomasa con respecto al consumo de sustrato en las diferentes etapas de la fermentación	60
9	Parámetros cinéticos basados en la concentración inicial de sustrato	64
10	Parámetros cinéticos de <i>Lb. casei</i> en un medio a base de suero lácteo obtenidos por las ecuaciones de Lineweaver-Burk y Augustinsson	66

11	Parámetros cinéticos y estequiométricos reportados en distintos trabajos	67
12	Modelo no. 6 reportado por Altioik <i>et al.</i> , en 2004, para la formación de biomasa, ácido láctico y consumo de sustrato	69
13	Sistema de ecuaciones empleados para modelar los datos experimentales de formación de biomasa, generación de producto y consumo de sustrato	70
14	Parámetros estimados para el modelo 1 y 2 para el ajuste de las cinéticas de consumo de sustrato y producción de biomasa y ácido láctico, de una fermentación tipo lote con <i>Lb. casei</i> .	71
15	Valores de la dismicnución en el flujo de permeado, retención de lactosa, recuperación y concentración de ácido láctico a los 20 min de proceso	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Molécula de ácido láctico vista desde diferentes perspectivas	3
2	Representación esquemática del sistema de transporte de lactosa de la fosfotransferasa a través de la membrana	10
3	Modelo para la recepción de la lactosa vía lactosa permeasa	11
4	Fermentación homoláctica integrada con la vía de la tagatosa	12
5	Diagrama básico de un sistema de separación por membranas	22
6	Rango de separación de los diferentes procesos de membrana	24
7	Rangos de presión, según el tamaño de partícula	24
8	Uso de las membranas en la industria láctea	25
9	Principio de exclusión de Donnan	30
10	Esquema del sistema experimental para la producción y separación de ácido láctico	43
11	Cinética de Monod	47
12	Curvas de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en un medio de cultivo a base de suero lácteo con 0.2 y 0.4 g/L de MgSO ₄ y diferentes concentraciones de MnSO ₄ como suplemento	49
13	Curvas de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en un medio de cultivo a base de suero lácteo con 0.6 g/L de MgSO ₄ y diferentes concentraciones de MnSO ₄ como suplemento	50

14	Cinéticas de producción de biomasa y consumo de sustrato de <i>Lactobacillus casei</i> en un medio de cultivo a base de suero lácteo bajo condiciones de suplementación: 0.05/0.5, 0.05/0.2 y 0.03/0.2 g/L de MnSO ₄ /MgSO ₄ respectivamente, en un proceso tipo lote	54
15	Cinéticas de producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus casei</i> en un medio de cultivo a base de suero lácteo bajo condiciones de suplementación: 0.05/0.5, 0.05/0.2 y 0.03/0.2 g/L de MnSO ₄ /MgSO ₄ respectivamente.	55
16	Perfil de la formación de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácido láctico bajo condiciones de suplementación de 0.03/0.2 g/L de MnSO ₄ /MgSO ₄ en un proceso de fermentación tipo lote por <i>Lb. casei</i>	61
17	Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod	64
18	Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Lineweaver-Burk y a la ecuación de Augustinsson	65
19	Estimación del modelo de Altiok y datos experimentales para la formación de biomasa, producto y consumo de sustrato	68
20	Estimación del modelo 1 y datos experimentales para la formación de biomasa, producto y consumo de sustrato	73
21	Estimación del modelo 2 y datos experimentales para la formación de biomasa, producto y consumo de sustrato.	74
22	Flujo de permeado obtenido bajo diferentes pH de alimentación , a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para las membranas TFC-SR3 y TFC-SR2 a una presión de 150 y 300 psig en el flujo de retención	76

23	Retención de lactosa obtenida bajo diferentes pH de alimentación a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para la membrana TFC-SR3 a una presión de 150 y 300 psig en el flujo de retención	79
24	Retención de lactosa obtenida bajo diferentes pH de alimentación, a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para la membrana TFC-SR2 a una presión de 150 y 300 psig en el flujo de retención	80
25	Recuperación de ácido láctico en el flujo de permeado bajo diferentes pH de alimentación , a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para las membranas TFC-SR3 y TFC-SR2 a una presión de 150 y 300 psig	83

1. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es un compuesto muy versátil de amplias aplicaciones en la industria alimentaria como acidulante, conservador, saborizante, agente controlador de pH entre otras, así como en la industria química, farmacéutica, textil, cosmética y de plásticos biodegradables. Se conoce de acuerdo a la nomenclatura oficial como ácido 2-hidroxi-propanoico de fórmula $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$). Existen dos formas ópticamente activas, D(-) y L(+) ácido láctico. Este puede ser producido industrialmente por síntesis química y por procesos de fermentación. Por síntesis química se obtiene de la hidrólisis de lactonitrilo produciendo únicamente una mezcla racémica (DL) de ácido láctico ópticamente inactivo. Por procesos de fermentación es posible la producción de isómeros dextrógiros, levógiros o una mezcla racémica, dependiendo del microorganismo involucrado en el proceso, siendo de mayor interés la producción del isómero (L) que puede ser asimilado por el organismo así como la mezcla racémica que es usada para la elaboración de polímeros así como para uso industrial. La producción de ácido láctico por bioprocesos puede ser llevada a cabo a partir de una extensa variedad de sustratos, entre los cuales se pueden citar productos secundarios de la industria alimentaria como el suero lácteo.

El suero lácteo es un subproducto del proceso de elaboración de queso con altas cantidades de material orgánico como proteínas (8.4 g/L), lactosa (65 g/L), grasa (<2.5 g/L) y sales minerales (5.6 - 8.4 g/L), lo cual le proporciona propiedades como potencial contaminante del medio ambiente debido a las dificultades que conlleva su drenado. Actualmente, la mayoría del suero es tratado por ultrafiltración eliminando la proteína presente, el cual es utilizado como sustrato fermentable por los microorganismos como las bacterias ácido lácticas (ej., *Lactobacillus casei*) para la producción de ácido láctico mediante fermentaciones tipo lote.

Los procesos fermentables convencionales (en lote) para la producción de ácido láctico tienen baja productividad y costos de operación elevados debido a

los procesos de separación, tradicionales, necesarios para la recuperación y purificación del ácido. Por lo que, en orden de disminuir costos, se han hecho estudios sobre los diferentes procesos de separación de ácido láctico como la extracción reactiva, intercambio iónico, electrodiálisis, destilación y tecnología de membranas; de los cuales este último ha mostrado grandes ventajas, como bajos costos de operación, comparado con los procesos tradicionales de separación.

En los últimos años los esfuerzos en la investigación del ácido láctico, están enfocados a disminuir los costos de producción a través de nuevos sustratos, nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades, nuevas tecnologías de fermentación y separación, así como también mediante la modelación matemática del proceso de producción de ácido láctico, la cual permite realizar predicciones sobre el sistema y su optimización. La producción de ácido láctico puede ser modelada a partir de tres variables de gran importancia que describen el proceso, consumo de sustrato, formación de biomasa y producto. Por lo cual se pretende caracterizar el proceso de obtención de ácido láctico por fermentación en lote a partir de suero lácteo utilizando *Lb. casei*, así como evaluar la separación de ácido láctico formado a través de tecnologías de membrana.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

El ácido láctico es un compuesto químico muy versátil con amplias aplicaciones en la industria alimentaria, por lo cual en los últimos años se han buscado vías novedosas y de bajo costo para su producción y purificación, a través de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación y separación, así como también nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades (Serna y Rodríguez, 2005).

2.1. Ácido láctico

2.1.1. Generalidades

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

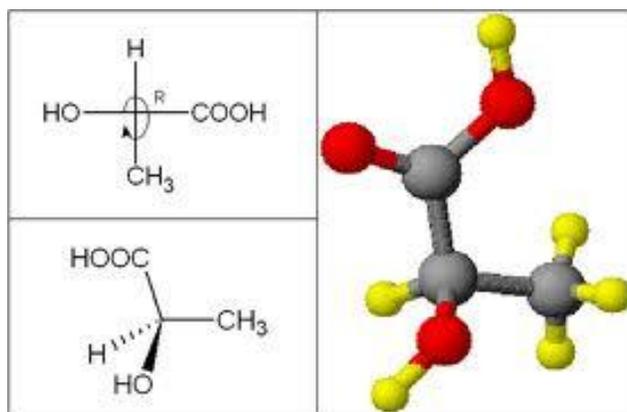


Figura 1. Molécula de ácido láctico vista desde diferentes perspectivas

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico (Figura 1) lo cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D(-) ácido láctico y L(+) ácido láctico, además de una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano (Altiok, 2004). Tanto las dos formas ópticamente activas como la forma racémica se encuentran en estado líquido, siendo incoloros 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 producir el ácido de forma anhidra; es por esta razón que se manejan rangos de 18- 33°C. El punto de ebullición del producto anhidro esta entre 125-140°C. Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición. Las propiedades fisicoquímicas del ácido láctico se muestran en la Tabla 1 (Serna y Rodríguez, 2005).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del ácido láctico (Serna y Rodríguez, 2005; Ríos 2011).

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

2.1.2. Aplicaciones

Actualmente la demanda mundial de ácido láctico está en aumento, debido a sus múltiples aplicaciones en el campo alimentario y no alimentario, en especial en la fabricación de biopolímeros (Cui *et al.*, 2012). Esto se debe en gran medida por la propiedad única de tener presente en su estructura un grupo ácido carboxílico y un hidroxilo, lo cual hace posible su participación en una amplia

variedad de reacciones químicas como esterificación, condensación, polimerización, reducción y sustitución, y esto contribuye a su gran potencial como plataforma química para una amplia gama de productos con extensas aplicaciones industriales (Altiok 2004; Pal *et al.*, 2009).

El ácido láctico se utiliza en muchos alimentos; en su mayoría es empleado para la producción de emulsificantes, aditivos alimentarios, aplicaciones farmacéuticas y de cosméticos. Es un ácido orgánico muy importante con un gran mercado debido a sus múltiples propiedades (Altiok *et al.*, 2006). Por ejemplo, el ácido láctico y sus sales son preferidos a otros ácidos orgánicos en la industria de alimentos ya que no dominan otros sabores, es no volátil, no tiene olor y es clasificado como GRAS por la FDA en Estados Unidos y por otras agencias reguladoras en otros países, algunos de sus usos es como conservador, acidulante y potenciador de sabor en muchos alimentos o bebidas (ej., cerveza, gelatina, quesos, entre otros) (John *et al.*, 2007). Por otra parte, la posibilidad de la conversión directa de ácido láctico a ácido acrílico, lo ha convertido en una importante materia prima para la industria química (Alonso *et al.*, 2010).

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

2.1.3. Producción mundial

La producción mundial de ácido láctico en 2011 fue mayor a 300 000 toneladas y se estima un incremento promedio del 10% anualmente (Higson, 2011). En la última década, la producción de ácido láctico ha crecido

considerablemente, debido principalmente al desarrollo de nuevas aplicaciones del ácido láctico, como la síntesis de ácido poliláctico y al avance de tecnologías para su producción, donde el 90% de la producción se lleva a cabo mediante procesos de fermentación (Cui *et al.*, 2012).

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 en Holanda, Galactic en Bélgica, entre otras. Las cuales emplean vías tecnológicas para la producción de ácido láctico (Datta y Henry, 2006; John *et al.*, 2007).

2.1.4. Procesos de producción

El ácido láctico puede ser producido por síntesis química o biotecnológica. La producción química, está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) lo cual produce un lactonitrilo que puede ser hidrolizado a ácido láctico (Amrane y Prigent, 1994). Otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador (González *et al.*, 2008). Este proceso es costoso debido a que el petróleo es la base de la materia prima. Además que, las rutas de la síntesis química producen una mezcla de L-ácido láctico y D-ácido láctico. Los problemas de alto costo de materia prima así como la dependencia de otras industrias para su obtención aunado a la impureza del producto, hacen de los procesos basados en fermentaciones la mejor opción para producir ácido láctico (Narayanan *et al.*, 2004; Fontes *et al.*, 2010).

La producción biotecnológica está basada en procesos de fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos, y tiene la ventaja de formar enantiómeros D(-) y/o L(+), ópticamente activos, o una mezcla racémica, dependiendo del microorganismo involucrado en el proceso, la inmovilización o

recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono y nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos, 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 y para uso industrial (Hofvendahl y Hanh, 2000; Litchfield, 2009).

Ambos métodos para la producción de ácido láctico, químico y biotecnológico, son asequibles, sin embargo la producción biotecnológica ofrece un gran número de ventajas comparada con la síntesis química como el bajo costo de sustratos, temperaturas de operación moderadas, y bajo consumo de energía (John *et al.*, 2007). Por otra parte, la producción de ácido láctico por procesos de fermentación ha incrementado su demanda de mercado, particularmente en industrias alimentarias, dado a la preferencia de productos de origen natural por parte de los consumidores, así como también en la industria de polímeros, debido a las perspectivas de respeto al medio ambiente y por el uso de fuentes renovables en lugar de petroquímicos (John *et al.*, 2007).

Recientemente se ha investigado la aplicación de diferentes microorganismos en los procesos de fermentación, así como mezclas de éstos con el objetivo de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades en un menor tiempo. Los microorganismos mayormente investigados se encuentran dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) como el *Lactobacillus helveticus* y más recientemente el *Lactobacillus casei* (John *et al.*, 2007).

2.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)

2.2.1. Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias con forma de coco o de bastón, que pueden variar en formas largas o delgadas, curvas o

cortas, son Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas y por lo general inmóviles, se clasifican como anaerobias facultativas, con un metabolismo estrictamente fermentativo en el que se produce ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares (Axelsson, 2004). La mayoría de las especies pertenecientes a este grupo tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5. Esta tolerancia ácida les da ventajas competitivas sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento varía entre géneros y está en un rango entre 20°C a 45°C (Serna y Rodríguez, 2005). Las bacterias del ácido láctico tienen capacidades biosintéticas limitadas, por lo que requieren nutrientes complejos ricos en vitaminas (especialmente vitamina B), aminoácidos, purinas y pirimidinas, debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. Por lo tanto ellas se encuentran en la naturaleza en ambientes nutricionalmente ricos (Serna y Rodríguez, 2005).

Las BAL comprenden principalmente los siguientes géneros, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. De las cuales el género *Lactobacillus* es el predominante del grupo de las BAL, y actualmente son reconocidos más de 125 especies y subespecies (Axelsson, 2004; Panesar *et al.*, 2007).

La mayoría de las BAL producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico; debido a que las formas isoméricas de la enzima lactato deshidrogenasa presente en las BAL determinan el isómero de ácido láctico producido por su estereoespecificidad (Amrane 2001, 2005). Sin embargo algunas BAL producen formas racémicas donde el isómero predominante depende de cambios de aireación, cantidad de NaCl, tipo de fermentación, incrementos en el pH y concentración de sustrato (Hofvendahl y Hhan, 2000).

La clasificación de las BAL en los diferentes géneros se basa principalmente en la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, el

crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia a crecer en medios alcalinos o ácidos (Kashket, 1997; Axelsson, 2004).

Las BAL se clasifican en tres grupos en función de su forma de metabolizar los azúcares (Ghaly *et al.*, 2004):

- El grupo 1 lo conforman las especies homofermentadoras obligadas de hexosas a lactato, no fermentan pentosas.
- En el grupo 2 se encuentran las especies heterofermentadoras facultativas de hexosas, es decir fermentan hexosas a través de la glucólisis a ácido láctico, ácido acético, etanol y formiato, además fermentan pentosas a lactato y acetato por la vía de la fosfoacetolasa.
- Por último el grupo 3 está conformado por especies heterofermentadoras obligadas.

2.2.2. Metabolismo de los azúcares

La principal característica del metabolismo de las BAL es la fermentación eficiente de carbohidratos junto con la fosforilación a nivel sustrato, necesario para la obtención de energía, ya que las BAL no son capaces de generar energía a través de la actividad respiratoria, y por lo tanto se basan principalmente en las reacciones que se producen durante la glucólisis para obtener energía en forma de ATP, esta energía se utiliza básicamente para realizar funciones específicas de mantenimiento como el transporte de nutrientes, entre otras (Hofvendahl y Hahn, 2000; Nousiainen *et al.*, 2004).

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 (Figura 2) 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 fosfoenolpiruvato (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), proteína de la membrana citoplasmática, 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 *et al.*, 2004; Walstra *et al.*, 2006).

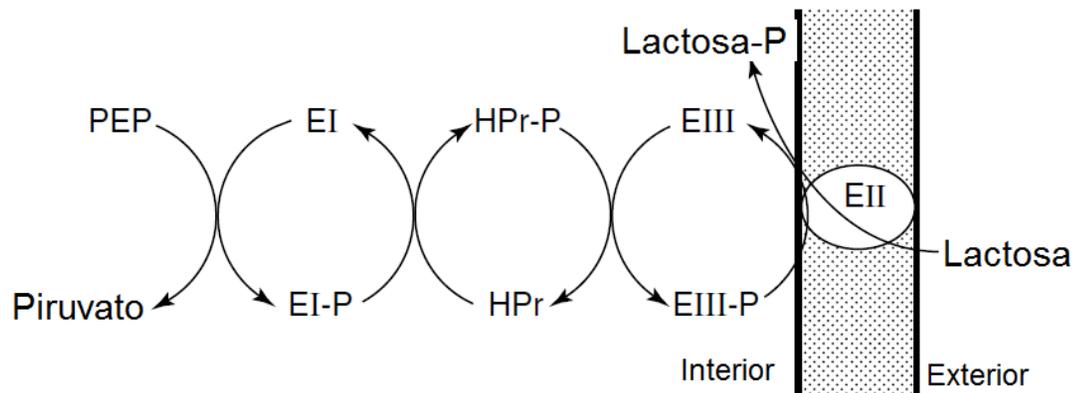


Figura 2. Representación esquemática del sistema de transporte de lactosa de la fosfotransferasa a través de la membrana (Walstra *et. al.*, 2006)

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 (Figura 3). 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 una fuerza protón motriz desarrollada por la ATPasa transmembrana a expensas de la hidrólisis de ATP (Mäyrä-Mäkinen *et al.*, 2004; Walstra *et al.*, 2006).

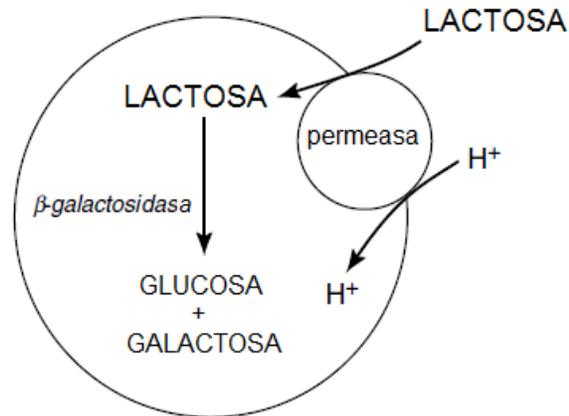


Figura 3. Modelo para la recepción de la lactosa vía lactosa permeasa (Walstra *et al.*, 2006).

En el metabolismo homofermentativo (Figura 4), se produce predominantemente ácido láctico y las bacterias utilizan las hexosas siguiendo la ruta glucolítica de Embden-Meyerhof, las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son *Lb. delbruekii*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*, *Lc. Lactis*, entre otras. La estequiometría clásica de la fermentación homoláctica es la siguiente (Axelsson, 2004; Serna y Rodríguez, 2005).



Un mol de glucosa o galactosa es transformado en 2 moles de ácido láctico, produciendo una ganancia neta de 4 moléculas de ATP por molécula de lactosa (Limsowtin *et al.*, 2002; Axelsson, 2004).

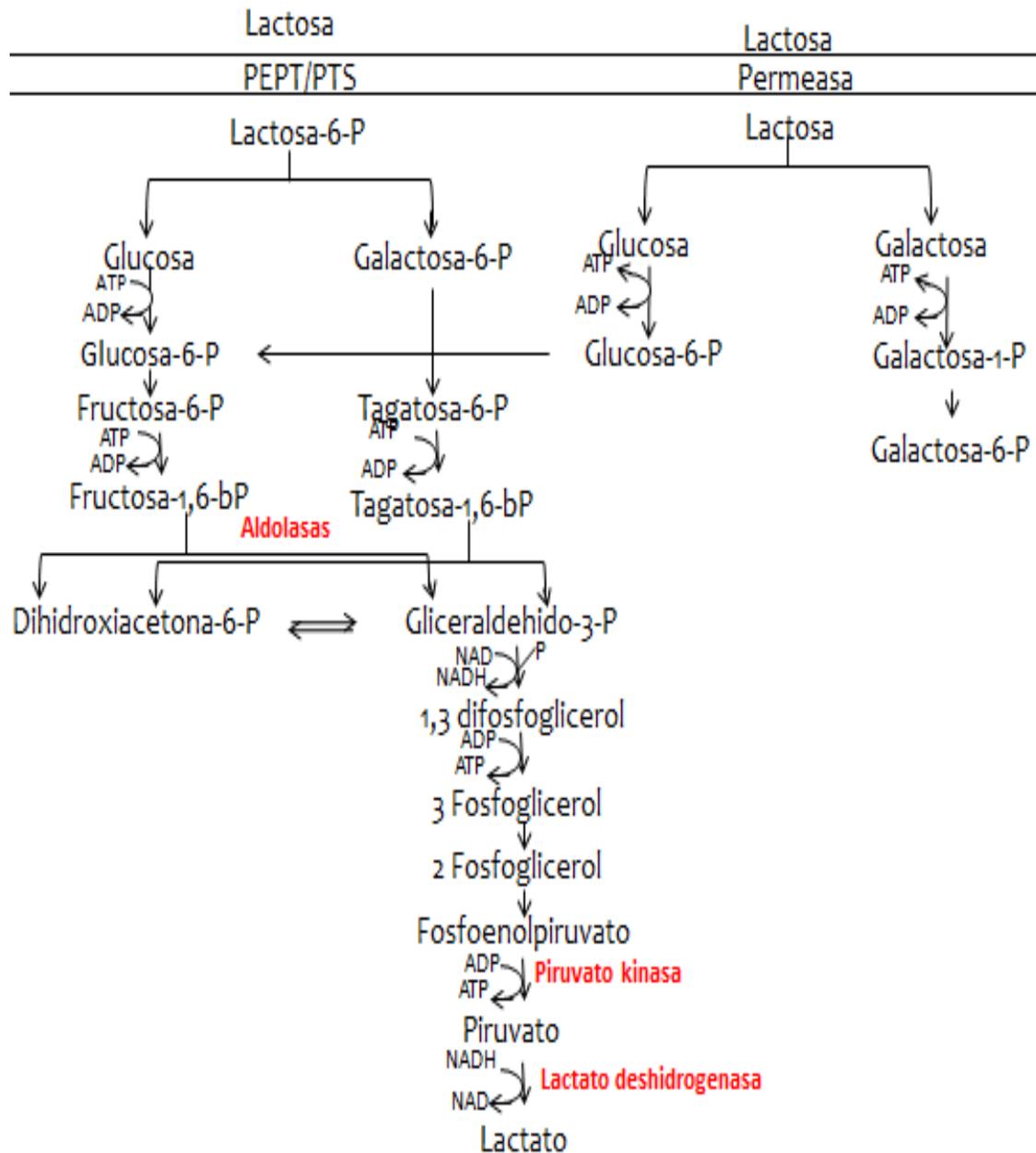


Figura 4. Fermentación homoláctica integrada con la vía de la tagatosa (Axelsson, 2004).

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-fostato o fructosa-6-fostato después de la isomerización y/o fosforilación. Una excepción importante es el metabolismo de la galactosa del

Lb. casei, la cual es metabolizada tanto a través de la ruta de la tagatosa 6-fosfato (Figura 4). 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 *et al.*, 2004).

2.2.3. Características de *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es una bacteria mesófila, con morfología de bacilo; su metabolismo depende de la cepa, algunas presentan un metabolismo homofermentativo y otras son heterofermentativas facultativas (Grupo 2). Es productora de ácido láctico predominantemente de 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, siendo sus óptimos 6.0 y 37°C respectivamente (Walstra *et al.*, 2006). Se le considera generalmente como segura (GRAS) y tiene un amplio número de aplicaciones en la industria alimentaria.

Debido a la elevada capacidad del *Lactobacillus casei* para producir ácido láctico, así como la presencia de la lactato deshidrogenasa específica para el isómero de ácido láctico L en su metabolismo (Axelsson, 2004) hay un creciente interés en la optimización y maximización en la producción biotecnológica de ácido láctico con este microorganismo (Alvarez *et al.*, 2010).

El *Lb. casei* puede generar además otros productos a partir de piruvato, esto depende de la concentración del sustrato en el que se encuentre, es decir, en fermentaciones que implican altas concentraciones de lactosa o glucosa el principal producto formado es el ácido láctico mientras que a concentraciones muy bajas de estos azúcares es posible la obtención de otros productos como, acetato, etanol, entre otros (Axelsson, 2004).

2.2.4. Factores que afectan el crecimiento de *Lb. casei* y la eficiencia en la producción de ácido láctico.

La efectividad del proceso biotecnológico de producción de ácido láctico puede ser medida como la concentración de ácido láctico producido, el rendimiento de ácido láctico basado en el sustrato consumido y como la velocidad de producción del ácido láctico (Serna y Rodríguez, 2005). Esto depende de diferentes factores, los cuales pueden afectar el crecimiento del *Lb. casei* en el medio de fermentación, algunos de estos son: la fuente de carbono y nitrógeno, el tipo de fermentación, la inmovilización y recirculación de microorganismos, el pH, la temperatura, la formación de subproductos, el tipo de ácido láctico generado, la densidad celular, entre otros (Panesar *et al.*, 2007; Hofvendahl y Hanh, 2000).

2.2.4.1. Micronutrientes

Como su nombre lo dice los micronutrientes se requieren en muy pequeñas cantidades, sin embargo son de suma importancia en el funcionamiento celular, además que, funcionan como cofactores y sirven de estructura para varias enzimas (Madigan *et al.*, 2004). Por ejemplo, el manganeso, es un factor de crecimiento esencial para el *Lb. casei* debido a su función como constituyente de la enzima lactosa deshidrogenasa, por consiguiente, debe ser añadido al medio de cultivo en forma de $MnSO_4 \cdot H_2O$. Esto es necesario junto con la suplementación de extracto de levadura para mejorar la productividad del ácido láctico y el consumo de lactosa (Fitzpatrick *et al.*, 2010; Ghaly *et al.*, 2004). Las cantidades de todos los nutrientes en el medio son muy críticas. Por ejemplo, el exceso de concentración de un nutriente puede inhibir el crecimiento celular. Por otra parte, si las células crecen ampliamente, sus productos metabólicos finales se acumulan y a menudo interrumpen los procesos bioquímicos normales de las células.

2.2.4.2. Temperatura

El *Lb. casei* se clasifica como una bacteria mesófila con una temperatura óptima de producción de ácido láctico de 37 °C. Sin embargo la velocidad de formación de producto es muy similar en el rango de temperatura de 32°C a 42°C, por lo que el efecto de la temperatura no es significativo en este intervalo. (Hujanen y Linko, 1996; Büyükkleci y Harsa, 2004).

2.2.4.3. pH

La concentración de iones hidrogeno es un parámetro importante que tiene un fuerte efecto en la producción de ácidos orgánicos formados durante los procesos de fermentación debido a que cuando se acumulan en gran cantidad en el caldo de fermentación inhiben el crecimiento del microorganismo. Estos iones hidrógeno acumulados se pueden controlar adicionando agentes neutralizantes al caldo de fermentación (Ríos, 2011). Estudios anteriores han demostrado que para una rápida y completa fermentación, el intervalo de pH óptimo para *Lb. casei* es de 5.5 a 6.5. La fermentación es fuertemente inhibida a pH bajos y cesa a valores de pH menor de 4.5 (Büyükkleci y Harsa, 2004).

2.2.4.4. Tipo de fermentación

El ácido láctico es comúnmente producido en fermentaciones tipo lote. Al comparar la fermentación tipo lote y continua, se observa que la continua genera mayores productividades dejando una concentración residual de sustrato mientras que en el tipo lote se utiliza todo el sustrato y se puede presentar un efecto toxico de los productos hacia los microorganismos (Hofvendahl y Hanh, 2000).

2.2.4.5. Fuente de Nitrógeno

La suplementación del medio de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno es uno de los factores clave en la fermentación (Ríos, 2011).

El alto costo del extracto de levadura limita su uso en las fermentaciones y la concentración del extracto de levadura en los procesos industriales es, en la mayoría de los casos, subóptima (Fitzpatrick *et al.*, 2010). 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.

2.2.4.6. Fuente de carbono

Un número de diferentes sustratos han sido usados para la producción fermentativa de ácido láctico por las BAL. El contenido de nutrientes en el medio de cultivo es elemental en el crecimiento de la biomasa y por consiguiente en la concentración y productividad logradas de ácido láctico. Una de las formas más comunes de suministrar la fuente de carbono en el medio de cultivo es por medio de diversos azúcares como la glucosa, galactosa, lactosa, entre otros (Madingan *et al.*, 2004). Al emplear azúcares puros en la fermentación se obtienen mayores rendimientos, sin embargo esto no es favorable económicamente, debido al alto costo de estos azúcares. (Hofvendahl y Hanh, 2000). Una alternativa atractiva para reemplazar estos materiales refinados y de alto costo, son los residuos agroindustriales o subproductos generados en grandes cantidades, los cuales tienen muy bajo costo, tales como el suero de leche (Burgos-Rubio *et al.*, 2010; Mussato *et al.*, 2008).

2.3. Suero lácteo

El suero lácteo es definido como la sustancia acuosa de la leche, la cual se obtiene por separación de la cuajada resultante de la coagulación de la caseína en la elaboración de queso (Parra, 2009). Existen varios tipos de suero lácteo dependiendo principalmente de la forma de coagular la caseína, el primero, denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina (quimosina) a pH 6.5 (Alonso *et al.*, 2010). El segundo, llamado ácido, resulta del proceso de

fermentación de cultivos iniciadores o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2003). La Tabla 2 resume la composición nutricional del suero lácteo dulce y ácido, observándose un mayor contenido de lactosa en el suero dulce y mayor proteína en el ácido (Panesar *et al.*, 2007).

Tabla 2. Composición típica del suero lácteo dulce y ácido (Panesar *et al.*, 2007)

Componente	Suero lácteo dulce (g/L)	Suero lácteo ácido (g/L)
Sólidos totales	63 – 70	63 – 70
Lactosa	46 – 52	44 – 46
Proteína	6 – 10	6 – 8
Calcio	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6
Fosfatos	1 – 3	2 – 4.5
Lactato	2	6.4
Cloruros	1.1	1.1

En cualquiera de los dos tipos de suero lácteo obtenidos se estima que por cada kilogramo de queso se producen 9 kg de suero lácteo, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Liu *et al.*, 2005). Entre los más abundantes de estos nutrientes se encuentra la lactosa (4.4 - 5.2% p/v), proteínas solubles (0.6 - 0.8 p/v), lípidos (0.4 - 0.5 % p/v) y sales minerales (8 - 10% de extracto seco) (Londoño, 2006; Panesar *et al.*, 2007; Parra, 2009). Presenta una rica cantidad de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Cuenta también con vitaminas del grupo B (ej., tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina; Tabla 3) y ácido ascórbico (González, 1996, Londoño *et al.*, 2008).

Tabla 3. Contenido de vitaminas del suero lácteo (Parra, 2009)

Vitaminas	Concentración (mg/mL)
Tiamina	0.38
Riboflavina	1.2
Ácido nicotínico	0.85
Ácido pantoténico	3.4
Piridoxina	0.42
Cobalamina	0.03
Ácido ascórbico	2.2

Este gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3.5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6.8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de suero lácteo líquido (Muñi *et al.*, 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Parra, 2009).

2.3.1. Suero lácteo como contaminante: problemática actual

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países industrializados y en vías de desarrollo. Aproximadamente el 90 - 85% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como suero lácteo el cual retiene cerca del 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental (Aider *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2009) debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando es desechado en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Aider *et al.*, 2009).

Según Almécija (2007) la distribución de la producción del suero lácteo en el mundo en el 2005 fue: Europa 53%, América del Norte y Central 28%, Asia 6%, África 5%, Oceanía 4%, América del Sur 4%, anualmente estos porcentajes representan 110-115 millones de toneladas métricas de suero lácteo producidas a nivel mundial a través de la elaboración de queso (Londoño, 2006; Parra, 2009). En México se reportó una producción de queso de 275 000 toneladas de queso en el 2010 lo que significa una generación estimada de 1 560 000 ton de suero lácteo (SIAP, 2012). Además menos del 15% del suero generado en México es recuperado y usado, principalmente para aplicaciones de bajo valor como la alimentación animal (Álvarez *et al.*, 2010). El porcentaje restante se desecha en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales, o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes ocasionando serios problemas de contaminación (Londoño, 2006). Por todo lo anterior el suero representa 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 en productos para el uso de alimentos. Una alternativa es emplear el suero como materia prima para generar productos mediante procesos biotecnológicos.

2.3.2. Aplicaciones del suero lácteo

El suero lácteo es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa como suero líquido. Debido a esto, el suero lácteo se trata mediante técnicas que permiten la extracción de sus componentes (ej., lactosa y proteínas), que constituyen fuentes potenciales para la alimentación humana (Urribarrí *et al.*, 2004). Además que el suero lácteo es una excelente materia prima para obtener diferentes productos a nivel tecnológico o como medio de formulación en procesos fermentativos. A pesar del problema de contaminación que se genera, existen una infinidad de productos que se pueden obtener. Dentro de estos productos están los aislados de

proteínas, bebidas fermentadas, productos de panadería, alcoholes, bebidas para deportistas, gomas, empaques biodegradables, ácidos orgánicos, entre otros (Parras, 2009).

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 en procesos de fermentación para la producción de ácido láctico, el cual incluye dos etapas claves: la fermentación y recuperación del producto (Burgos-Rubio *et al.*, 2010; Büyükkileci y Harsa, 2004). El mayor desafío en la producción de ácido láctico a partir de sustratos complejos como el suero de lácteo, está localizado en su recuperación (o purificación) y no en la fermentación. Por lo cual, en los últimos años se han estudiado diversos enfoques y combinaciones para su recuperación de caldos de fermentación (Li *et al.*, 2008). El proceso tradicional para la recuperación de ácido láctico incluye una neutralización con una base seguida de una filtración, concentración y acidificación; este proceso genera sales de calcio como subproducto, ocasionando costos químicos altos así como la generación de residuos. Existen otras alternativas para la recuperación de ácido láctico como la extracción con solventes, adsorción, destilación directa, nanofiltración y electrodiálisis, sin embargo la mayoría de estos métodos son limitados y costosos, con excepción de la nanofiltración, la cual ha mostrado un gran número de ventajas sobre los otros (Li y Shahbazi, 2006; Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008)

2.4. Tecnología de membrana

Las membranas son barreras delgadas que permiten el paso preferencial de ciertas sustancias en un nivel de tamaño microscópico o molecular (Boussu *et al.*, 2007). A partir de este atributo, una amplia área de la ciencia y la tecnología ha evolucionado a lo largo de las últimas décadas, donde los procesos de membrana

se utilizan como métodos eficaces y económicos para la separación y purificación de diferentes sustancias (Lee y Koros, 2002). Hoy en día, los procesos de membrana contribuyen en muchos sectores de la investigación científica y el desarrollo, la industria, la medicina, y la gestión de los recursos naturales, debido a su singular principio de separación y su eficiencia 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 combinado con otros procesos de separación, además que, no requiere aditivos y consume una menor cantidad de energía (Saxena *et al.*, 2009; Benitez *et al.*, 2011).

2.4.1. Fundamentos de los sistemas de membrana

De acuerdo con la definición dada por la Sociedad Europea de Membranas (European Membrane Society), las membranas son fases intermedias que separan dos fases y/o actúan como una barrera activa o pasiva en el transporte de materia entre fases (Chen *et al.*, 2009). Básicamente, es una capa delgada que puede separar los materiales en función de sus propiedades físicas y químicas cuando una fuerza impulsora, ya sea un gradiente de potencial químico (concentración o gradiente de presión) o potencial eléctrico, se aplica a través de la membrana (Bellona y Drewes, 2004). Algunos de los requisitos básicos de las membranas son

- Alto flujo del producto
- Buena resistencia mecánica para soportar la estructura física
- Buena selectividad a las sustancias deseadas
- Buena capacidad de retención de acuerdo con la aplicación específica
- Estabilidad química y térmica, así como a agentes de limpieza y desinfección
- Resistencia contra la acción microbiana
- Suave, superficie resistente a las incrustaciones

En general, una alta selectividad está relacionada con propiedades de la membrana, tales como poros pequeños y la resistencia hidráulica de alta o baja permeabilidad, la cual puede verse comprometida por una distribución de tamaño de poro amplio, debido a que la permeabilidad aumenta al aumentar la densidad de los poros. Por otra parte la resistencia de la membrana, en general, es directamente proporcional a su espesor. Por lo tanto, una buena membrana debe tener una estrecha gama de tamaños de poros, una alta porosidad, y una capa delgada de material (Chen *et al.*, 2009).

Un sistema de membrana de separación separa una corriente influente en dos corrientes de efluentes: el permeado y el retenido o concentrado, como se muestra en la Figura 5. El permeado es la porción del fluido que ha pasado a través de la membrana mientras que el retenido contiene los componentes que han sido rechazados por la membrana.

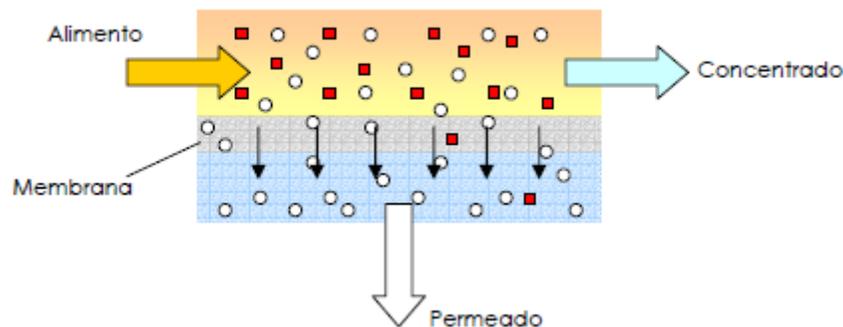


Figura 5. Diagrama básico de un sistema de separación por membranas (Cuartas-Urbe, 2005)

2.4.2. Clasificación de las membranas

Las membranas se pueden clasificar como densas o porosas. La separación por membranas densas se basa en la interacción fisicoquímica entre los componentes del flujo a separar y el material de la membrana. Membranas porosas, por otra parte, consiguen la separación por exclusión de tamaño, en las

que el material es rechazado, ya sea disuelto o suspendido, en función de su tamaño relativo a la del poro (Berk, 2009).

Otra manera de clasificarlas es por la naturaleza del material del que están hechas, estas pueden ser orgánicas (poliméricas) o inorgánicas (cerámicas o metálicas) (Chen *et al.*, 2009). La mayoría de las membranas comerciales orgánicas son hechas de una amplia variedad de polímeros orgánicos (ej., celulosa y derivados, polisulfones, poliamidas, entre otros). Las membranas inorgánicas pueden ser elaboradas a partir de óxidos de zirconio, titanio, silicio y aluminio (Berk, 2009; Chen *et al.*, 2009). El material de la membrana debe ser químicamente inerte, ya que de no serlo puede provocar un cambio no deseado en la composición de la alimentación y reducir la vida útil de la membrana. Las membranas con mayores aplicaciones son las asimétricas, estas membranas están compuestas de dos o más capas cada una de ellas puede tener diferente estructura o composición, lo cual proporciona características deseables durante la separación o purificación de determinado compuesto (Berk 2009).

2.4.3. Procesos de separación por medio de membranas

Un número considerable de procesos de separación a través de membranas ha encontrado aplicaciones industriales (Figura 6), los más importantes son la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI), las cuales utilizan una fuerza motriz para el transporte de material a través de la membrana por una diferencia de presión (Lee y Koros, 2002).

2.4.3.1. Microfiltración (MF)

La microfiltración es un proceso de separación sólido-líquido, el cual se está convirtiendo en una alternativa preferida a los procesos tradicionales más costosos (ej., filtración tradicional y centrifugación). Utiliza membranas con tamaño de poro del orden de 0,1 a 0,5 μm y trabaja a presiones entre 10-25 psig (Figura

7). Las aplicaciones más comunes (Figura 8) son la remoción de células bacterianas y la separación de macromoléculas, ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y en el tratamiento de aguas residuales (Lee y Koros, 2004).

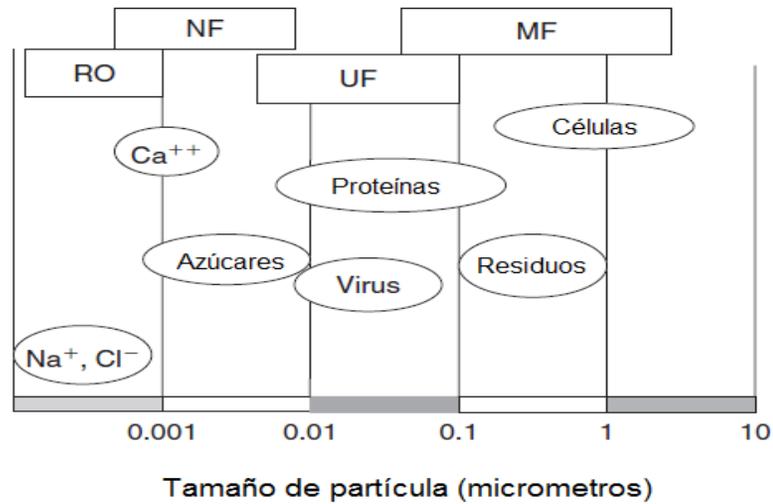


Figura 6. Rango de separación de los diferentes procesos de membrana (Chen *et al.*, 2009)

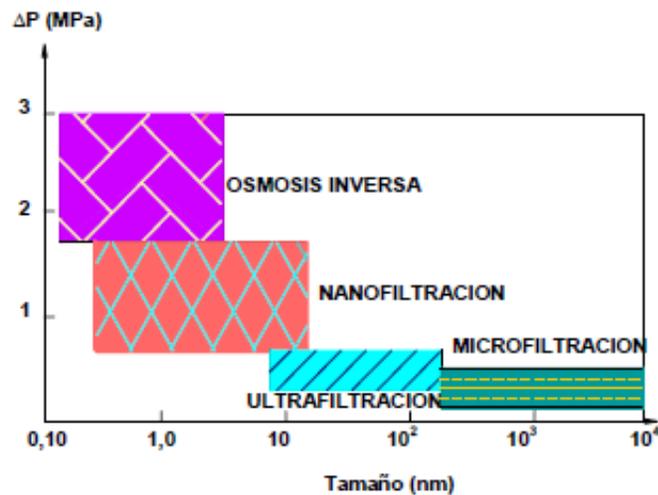


Figura 7. Rangos de presión, según el tamaño de partícula (Cuartas-Uribe, 2005)

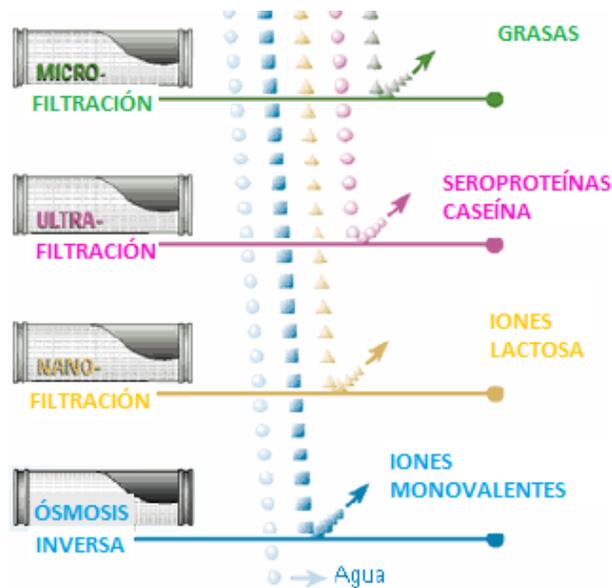


Figura 8. Uso de las membranas en la industria láctea (Cuartas-Uribe, 2005)

2.4.3.2. Ultrafiltración (UF)

Hoy en día, la tecnología de ultrafiltración (UF), está siendo utilizada en todo el mundo para el tratamiento de aguas. Las membranas de UF son capaces de retener componentes de peso molecular de 300-500 000 Daltons (Da), con tamaños de poros que van de 10 a 1000 Å (0,001 hasta 0,1 micras) y operan a una presión de 10 a 100 psig. La mayoría de las membranas de UF están hechas de materiales poliméricos como polisulfona, polipropileno, cloruro de polivinilo, etc. (Chen *et al.*, 2009). Una aplicación típica de las membranas de UF es la filtración de macromoléculas disueltas (ej., la concentración de las proteínas del suero lácteo), azúcares, biomoléculas, polímeros, proteínas de alto peso molecular y partículas coloidales, además es posible llevar acabo separaciones de proteína-proteína basadas en el tamaño y la carga (Walstra *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009).

2.4.3.3. Ósmosis inversa (OI) y Nanofiltración (NF)

La ósmosis inversa es capaz de eliminar partículas con un peso de 150-250 Da, como sólidos disueltos, sales, bacterias, virus y otros gérmenes contenidos en el agua, tiene un tamaño de poro que va de 0.5 a 1.5 nm (5 – 15 Å)

y trabaja a altas presiones (entre 100-1500 psig), su principal aplicación es la desalinización del agua de mar para su conversión en agua potable, utiliza membranas hechas de polímeros, acetato de celulosa y varios tipos de poliamida, y se han valorado en 96-99% de rechazo de NaCl. El principal problema de la OI son las posibles incrustaciones en la membrana, causado por partículas y materias coloidales que se concentran en el lado de alimentación de la superficie de la membrana (Walstra *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). Por otra parte la nanofiltración utiliza membranas para separar diferentes fluidos o iones, con tamaños de poro más grandes que las de OI y menores a las de UF, puede funcionar a presiones entre 100 – 500 psig. Se utiliza para concentrar azúcares, sales divalentes, bacterias, proteínas, partículas, colorantes y otros constituyentes que tienen un peso molecular mayor que 1000 Da. Las membranas utilizadas para NF están hechas de acetato de celulosa y poliamida aromática con características tales como rechazos de sal de 95% para las sales divalentes y del 40% para sales monovalentes (Lee y Koros, 2004; Wang *et al.*, 2009).

2.4.4. Tipos de operación según el mecanismo de separación de membrana

El mecanismo de separación depende de alguna propiedad específica de los componentes que serán separados selectivamente por la membrana. Básicamente hay tres mecanismos de separación:

- 1) Separación debida a grandes diferencias de tamaño (mecanismo de cribado). En este tipo de separación se pueden clasificar las operaciones de membrana en: microfiltración, ultrafiltración y en parte nanofiltración.
- 2) Separación basada en las diferencias de solubilidad y difusividad de los materiales de las membranas (mecanismo de disolución-difusión). En este tipo de separación están los procesos de ósmosis inversa y nanofiltración.
- 3) Separación basada en las diferencias de carga de las especies a separar (efecto Donnan), característico de membranas de nanofiltración. (Cuartas-Uribe, 2005)

2.4.5. Factores que afectan la separación en nanofiltración

La nanofiltración (NF) es una técnica que combina características de ultrafiltración y ósmosis inversa, pues su mecanismo de separación se basa tanto en diferencias de tamaños, propio de la ultrafiltración, como en el modelo de disolución – difusión, tal como ocurre en ósmosis inversa. Las membranas de nanofiltración se caracterizan por poseer una ligera carga superficial, la cual le permite separar iones de diferentes valencias y tamaños, y según el grado de disociación posibilita el mejor rechazo de ácidos débiles.

Entre las aplicaciones de los procesos de nanofiltración se pueden mencionar la obtención y purificación de ácidos orgánicos (ej., ácido láctico) de caldos de fermentación donde se encuentran disociados (ej., lactato) entre residuos de azúcar y sales minerales. Una recuperación exitosa del ácido orgánico es aquella donde se logra su separación en el retenido, del resto del caldo de fermentación (ej., proteínas, células, minerales y lactosa) por medio de módulos de nanofiltración, en la cual los nutrientes del permeado pueden ser recirculados al fermentador (Li *et al.*, 2008). Sin embargo la purificación de dichos ácidos depende de diversos factores que pueden inhibir o favorecer el funcionamiento de la membrana y con ello la obtención del ácido orgánico.

Existen diversos factores que afectan y explican la retención de compuestos por medio de membranas de nanofiltración, estos pueden ser debido a la naturaleza de la membrana, a las propiedades de los compuestos a separar y la matriz donde se encuentran, al efecto Donnan, así como del mecanismo de disolución-difusión, el cual está intrínsecamente relacionado con el fenómeno de presión osmótica (Agenson *et al.*, 2003). Es importante tener en cuenta estos factores al elegir la membrana para la separación de determinado compuesto pues de esto depende la eficacia de dicha separación (Bellona *et al.*, 2004).

2.4.5.1. Corte de peso molecular (MWCO), grado de desalinización y porosidad de la membrana

Las características de rechazo de una membrana específica de NF a menudo se cuantifican por el MWCO. Por lo general, este parámetro se define como el peso molecular de un soluto que se rechaza el 90%, sin embargo, este puede variar entre 60 y 90% dependiendo de los protocolos utilizados por diversos fabricantes. El concepto MWCO se basa en la observación de que las moléculas en general, se hacen más grandes conforme aumenta su masa (Bellona *et al.*, 2004). De este modo al tener moléculas más grandes, los efectos de tamizado aumentan por impedimento estérico y la molécula es rechazada por la membrana más a menudo que una molécula de menor tamaño. Cabe señalar que el MWCO también puede ser relacionado con la difusión, debido a que una molécula más grande difunde a voluntad más lentamente que una molécula más pequeña. Otro parámetro que se utiliza con frecuencia para describir las características de rechazo de una membrana es el grado de desalinización. Este es comúnmente reportado como el porcentaje de rechazo de una solución de cloruro de sodio o sulfato de magnesio de 500 - 2000 mg/L (Mohammad *et al.*, 2010). Dado que el MWCO de una membrana es a menudo específico del fabricante, el grado de desalinización puede ser un parámetro útil en la estimación del rechazo de algunos compuestos (Bellona *et al.*, 2004). La porosidad se ha considerado como otro parámetro útil en estudios previos para estimar la separación de compuestos orgánicos. Esta se expresa generalmente como la densidad de poros (PSD) en la capa superior de la membrana. La PSD puede ser alterada bajo altas presiones y con esto el rechazo de los solutos, se ha observado que al aumentar la presión se incrementa la porosidad pero esto depende de la sensibilidad de la membrana (Agenson *et al.*, 2003).

2.4.5.2. Peso molecular, tamaño y geometría del soluto

Es posible la predicción del rechazo por parte de las membranas de compuestos no cargados y no polares utilizando el peso molecular del compuesto, debido a que el impedimento estérico puede ser un importante factor impulsor en

el rechazo de las moléculas de las membranas de NF (Bellona *et al.*, 2004). Una cuantificación del tamaño molecular (y la geometría) de un soluto, junto con el tamaño de poro de una membrana, podría ser un descriptor mejor del rechazo, que utilizar sólo el MWCO o el grado de desalinización. El peso molecular de un compuesto es fácil de determinar, pero no proporciona ninguna información sobre la geometría de una molécula, de este modo para evaluar el efecto de impedimento estérico en el rechazo de solutos determinados por NF, se ha desarrollado una forma sencilla pero eficaz para describir las características moleculares de una molécula (Bellona *et al.*, 2004). Por ejemplo el número de grupos metilo, puede ser un parámetro importante para predecir el rechazo de las moléculas no cargadas, debido a que compuestos no cargados con un mayor número de grupos metilo son rechazados en niveles más altos que aquellos con un menor número de grupos metilo. Recientemente se ha descubierto que los parámetros de tamaño molecular, tales como el ancho molecular, los radios de Stokes, y el tamaño molecular medio, han demostrado ser un mejor predictor de los efectos de impedimento estérico en el rechazo de solutos por membranas de NF. Encontrando que el rechazo aumenta al incrementarse los valores de dichos parámetros.

2.4.5.3. Carga del soluto y la membrana (Mecanismo de exclusión de Donnan)

La eficiencia de separación de membranas de nanofiltración en el tratamiento de soluciones iónicas puede ser explicada por la combinación de efectos de tamaño y carga (Bellona y Drewes, 2005). La carga de la membrana depende del pH de la solución y de su punto isoeléctrico (PI). Para muchas membranas de nanofiltración comerciales, el punto isoeléctrico se encuentra en el rango de pH entre 3 y 6. Así, las membranas de nanofiltración son generalmente cargadas negativamente en condiciones neutras o alcalinas y positivamente en condiciones altamente ácidas (Mänttari *et al.*, 2006). De este modo cuando una membrana de NF está cargada negativamente (pH neutro o alcalino), los solutos con altas densidades de cargas negativas son rechazados con mayor eficacia, por

efecto de repulsión electrostática (Figura 9). Por otro lado, el rechazo de solutos sin carga eléctrica es menos eficaz. Como resultado, la membrana cargada puede rechazar iones mucho más pequeños que el tamaño de los poros de la membrana, mientras que los solutos sin carga sólo son rechazados por razones estéricas (Bouchoux *et al.*, 2006). Por otro lado la carga de poros de la membrana podría tener un efecto significativo sobre el flujo de la membrana y el rechazo (Bellona y Drewes, 2005).

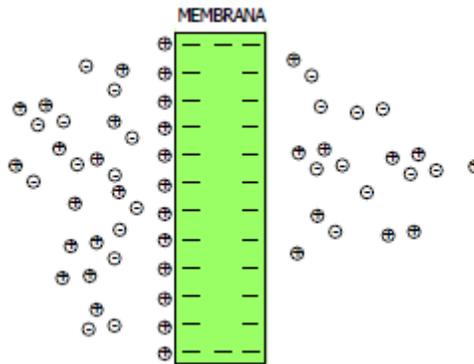


Figura 9. Principio de exclusión de Donnan (Cuartas-Uribe, 2005)

El tamaño de los poros de la membrana tiende a reducirse significativamente a valores de pH más altos, ya que los grupos carboxílicos cargados presentes en la membrana adoptan una conformación extendida de la cadena debido a la repulsión electrostática entre estos (González *et al.*, 2008). Esta conformación expandida reduce el tamaño del poro (o volumen de los poros) de la membrana y por lo tanto hace que el flujo disminuya (González *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2005). En el caso de un electrolito orgánico el equilibrio de disociación es de gran importancia, ya que este depende del pH. Por ejemplo la cantidad de ácido láctico no disociado y los iones lactato presentes en el caldo de fermentación se basan en el equilibrio ácido base (pH) en las condiciones de operación, lo cual puede favorecer o no su purificación de caldos de fermentación (González *et al.*, 2008; Sikder *et al.*, 2012). La carga fija de las membranas orgánicas depende en gran medida de su afinidad por los iones. Por lo tanto la

predicción de la retención iónica de un compuesto orgánico por una membrana de nanofiltración se vuelve muy específica y compleja (Bellona y Drewes, 2005; Bouchoux *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008).

2.4.5.4. Interacciones de adsorción entre la membrana y los solutos

La adsorción de compuestos hidrófobos en las membranas puede ser un factor importante en el rechazo de microcontaminantes durante las aplicaciones de membrana (Agenson *et al.*, 2003). La mayoría de las membranas de alta presión se consideran hidrófobas, y se caracterizan por su ángulo de contacto. Las membranas con ángulos de contacto mayores tienen la capacidad de rechazar y adsorber más masa por unidad de superficie de un compuesto hidrófobo que una membrana caracterizada con un ángulo de contacto menor (Mänttari *et al.*, 2006). El rechazo de la mayoría de las moléculas hidrófobas aumenta al incrementar la afinidad del soluto por la membrana, esto puede ser expresado a través del coeficiente de distribución de octanol-agua (K_{ow}), el cual describe la adsorción hidrofóbica de compuestos a las membranas (Bellona *et al.*, 2004). Los compuestos polares con tamaños similares a diámetros de poro de la membrana causan una mayor disminución de flujo a través de bloqueo de los poros o de adsorción dentro de los poros (Braeken *et al.*, 2005).

2.4.6. Caracterización de membranas

Para caracterizar las membranas es de mucha utilidad la medición del flujo de permeado (J_P), este se calcula midiendo el volumen de permeado recogido en un intervalo de tiempo determinado, por unidad de área según la siguiente ecuación:

$$J_P = \frac{Q_P}{A_m} \quad (2.1)$$

siendo, Q_P el caudal de permeado (L/h) y A_m el área efectiva de la membrana (m^2).

Otro parámetro importante es el índice de rechazo o selectividad (R_i), el cual determina la preferencia de la membrana por un soluto o solutos, así como la naturaleza de la membrana. Se calcula midiendo la concentración de soluto en la corriente de permeado y en la del alimento.

$$R_i(\%) = 1 - \frac{c_{p_i}}{c_{a_i}} \times 100 \quad (2.2)$$

Donde C_{a_i} y C_{p_i} son las concentraciones de la especie i en el alimento y en el permeado respectivamente. La recuperación de solutos proporciona información sobre la cantidad de soluto que pasa a través de la membrana y puede ser recuperado en el permeado. Este parámetro ayuda a cuantificar la capacidad de la membrana.

$$Rec_i(\%) = \frac{c_{p_i}}{c_{a_i}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.5. Modelación matemática de bioprocesos

La modelación matemática es un paso esencial en el desarrollo de un bioproceso ya que ésta nos permite crear una representación abstracta de un fenómeno con el objeto de tener un entendimiento mayor del mismo y así ser capaces de predecir su comportamiento. Los modelos son un conjunto de relaciones entre las variables de interés en el sistema que está siendo estudiado, se utilizan principalmente para definir los fundamentos de procesos biológicos, químicos, o físicos, así como también para planear las condiciones experimentales y la evaluación de los resultados. Particularmente, el propósito del modelaje matemático de bioprocesos es para diseñar procesos de fermentación a gran escala a partir de datos obtenidos de fermentaciones a pequeña escala y de este modo optimizar algún aspecto relevante del sistema (Sinclair y Kristiansen 1987; McNeil y Harvey 1990; Altiok, 2004; Ríos, 2011).

Los modelos matemáticos más comunes son los creados respecto al tiempo, sin embargo pueden depender también de otras variables. Para la

creación de un modelo se deben establecer, primeramente, una serie de suposiciones que describan las relaciones entre las variables a ser estudiadas en el sistema, estas relaciones deben ser medibles ya que describiran los aspectos más importantes del sistema ya que serán las bases del modelo. En seguida se definen las variables y los parámetros a ser usados en el modelo. En específico, un proceso biológico (ej., fermentación) es un fenómeno dinámico, es decir depende del tiempo de operación y puede ser descrito por un sistema de ecuaciones diferenciales, este involucra la cantidad de microorganismos (biomasa), la formación de producto y la concentración de sustrato, que cambian en función del tiempo. Una vez construido el modelo, se deben comparar las predicciones hechas por el modelo con los datos experimentales, si éstas concuerdan con los datos observados significa que las suposiciones hechas en la creación del modelo son acertadas y este puede ser usado, eventualmente, para realizar predicciones. En caso contrario se debe estudiar y mejorar las suposiciones del modelo (Altiok, 2004).

En procesos de fermentación pueden ser usados diferentes modelos entre ellos:

- Modelos cinéticos para predecir la velocidad de crecimiento del microorganismo, consumo de sustrato y producción de metabolitos.
- Modelos estequiométricos para predecir cuanto sustrato se necesita o producto es producido dada una cantidad conocida de biomasa.

Estos diferentes modelos se pueden poner juntos en un modelo, con el fin de predecir los efectos biológicos y físicos combinados en un fermentador y así optimizar el proceso.

El factor principal que impulsa a la biotecnología es la ganancia, lo cual está íntimamente ligado a la optimización de la formación de producto por catalizadores celulares, es decir, la biotecnología busca, principalmente, producir la máxima cantidad de producto en el menor tiempo posible con el menor costo (Altiok *et al.*, 2006).

El cultivo a gran escala de células es esencial para la producción de una gran proporción de productos biológicos comercialmente importantes. Por lo tanto, el sistema de cultivo celular debe ser descrito cuantitativamente, en otras palabras, la cinética del proceso debe ser conocida. Mediante la determinación de la cinética del sistema, es posible predecir los rendimientos y tiempos de reacción y por lo tanto permitir el correcto dimensionamiento de un biorreactor. Un modelo cinético puede ser muy útil para el diseño de sistemas de producción tanto continuos y por lotes.

En los procesos de fermentación por lotes no existe un estado constante. El control de un proceso de fermentación se basa en la medición de las propiedades bioquímicas, físicas o químicas del caldo de fermentación, así como en la manipulación de los parámetros ambientales (Carrillo-Ureta *et al.* 2001). El grado de realismo y complejidad requerida en un modelo depende de lo que se describe, optando siempre por el modelo más simple que pueda describir adecuadamente el sistema.

2.5.1. Modelos cinéticos de crecimiento microbiano y formación de producto

El crecimiento es la respuesta más esencial de los microorganismos a su entorno físico-químico. Es un resultado tanto de la replicación y el cambio en el tamaño celular. Requiere de sustratos principalmente para sintetizar nuevo material celular y productos extracelulares, así como para proporcionar energía a la célula. Así, el crecimiento, la utilización de sustratos, el mantenimiento y la formación de producto están estrechamente relacionados (Sinclair y Kristiansen 1987).

La mayoría de los modelos cinéticos, que describen el crecimiento microbiano, utilizan un enfoque empírico basado en la ecuación de Monod (1) o en alguna de sus numerosas modificaciones. Monod relaciona la velocidad de

crecimiento específico de determinado microorganismo (μ) con la concentración de sustrato (S), donde $\mu_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de crecimiento alcanzable cuando S es mucho mayor que K_s y las concentraciones de todos los otros nutrientes esenciales son constantes. La constante K_s se conoce como la constante de saturación o la constante de velocidad media y es igual a la concentración del sustrato limitante de la velocidad cuando la μ es igual a la mitad de su máximo (Bailey y Ollis 1986).

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

La ecuación de Monod describe empíricamente una amplia gama de datos de forma satisfactoria. Así bajo condiciones de crecimiento óptimas y sin efectos de inhibición, μ sigue la relación exponencial (2):

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

donde X (concentración de biomasa) incrementa con el tiempo independientemente de la disponibilidad de sustrato; sin embargo, el crecimiento celular sigue una tendencia hiperbólica, en la mayoría de los casos, y existe un límite para alcanzar la máxima concentración celular. Por lo que se introduce una nueva ecuación (3) para describir este comportamiento, donde $X_{m\acute{a}x}$ es la concentración de biomasa máxima (Altiok, 2004).

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

Algunas modificaciones de la ecuación de Monod toman en cuenta otros efectos de inhibición, un ejemplo es la ecuación de Levenspiel (4), la cual considera el efecto de inhibición por producto:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^h \quad (4)$$

donde $P_{m\acute{a}x}$ es la concentración de producto máxima arriba de la cual la bacteria no crece y h es el poder tóxico (Altiok *et al.*, 2006).

La formación de producto se describe comúnmente usando la ecuación de Luedeking-Piret (5) ya que la producción de ácidos orgánicos puede estar asociado o no con el crecimiento microbiano o tener un comportamiento mixto (α y/o β). Así la formación de producto depende de la concentración de biomasa X y de la velocidad de crecimiento dX/dt .

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

Han sido reportados diversos modelos para la producción de ácido láctico por fermentación a partir de diferentes sustratos y microorganismos, uno de estos fue por Ghaly y Tango en 2004 donde se utilizó suero lácteo como sustrato y *Lb. helveticus* como microorganismo. Por su parte Altiok en 2004 estudió la producción de ácido láctico por fermentación de suero lácteo usando *Lb. casei* y reportaron un modelo cinético de tres ecuaciones, la ecuación para el crecimiento de biomasa a parte de la ecuación de Monod sin inhibición (3), la ecuación para la formación de producto (5) es descrita por la cinética de Luedeking-Piret y el consumo de sustrato (6) se expresa como la conversión de sustrato para su mantenimiento, donde m_s es el coeficiente de mantenimiento de celular y Y_{ps} es el rendimiento de producto con respecto al sustrato.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{PS}} \frac{dP}{dt} - m_s X \quad (6)$$

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad han aumentado los esfuerzos en la investigación de la producción del ácido láctico, enfocados a disminuir costos a través de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación y separación, así como también nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades, esto es debido al uso tan versátil que posee. El principal obstáculo que se ha encontrado en la producción de ácido láctico de calidad alimentaria, son los procesos de recuperación y purificación que éste sufre después de su obtención por fermentación. Estudios basados en la tecnología de membranas han demostrado gran eficiencia y ventajas en su separación, descubriendo que las membranas de nanofiltración son muy convenientes en etapas de separación, purificación y concentración del ácido orgánico. Por otro lado se requieren fuentes de sustratos baratas, de alta disponibilidad y que proporcionen altos rendimientos en la producción de ácido láctico por fermentación, encontrando al suero lácteo una alternativa interesante y provechosa, debido a su alto contenido de lactosa. Anualmente en México se producen 1 560 000 toneladas de suero de leche (SIAP, 2011) de los cuales menos del 15% es aprovechado, por lo que es de suma importancia el uso de suero lácteo como fuente de sustrato para la producción de ácido láctico. Por todo lo anterior se pretende estudiar una alternativa novedosa para la separación de ácido láctico una vez producido por fermentación, obteniendo altos niveles de pureza y una calidad grado alimentaria. Además, se busca desarrollar un modelo matemático que permita describir acertadamente el proceso de producción de ácido láctico con el objetivo de predecir y optimizar el proceso.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el proceso de separación de ácido láctico mediante tecnología de membrana, así como caracterizar el proceso de obtención del mismo a partir de la fermentación de suero lácteo por *Lactobacillus casei*.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de distintas concentraciones de sulfato de manganeso y magnesio como suplemento en un medio de cultivo a base de suero lácteo sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC334, así como en la producción de ácido láctico y consumo de sustrato.
2. Evaluar el proceso de producción de ácido láctico, a partir de la fermentación de suero lácteo por *Lactobacillus casei*, a través de cinéticas de producción de biomasa y ácido láctico, y de consumo de sustrato en un proceso tipo lote.
3. Modelar matemáticamente la producción de ácido láctico en un proceso fermentativo tipo lote, mediante cinéticas de formación de producto y biomasa, así como del consumo de sustrato.
4. Determinar el efecto de las condiciones de operación de la unidad de filtración de membrana para la separación del ácido láctico del caldo de fermentación, tales como, tipo de membrana, material, tamaño de poro, pH, presión de operación.

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 -70°C.

5.1.2. Medio de Cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó suero lácteo dulce proveniente del Laboratorio de Tecnología de productos Lácteos de la Universidad Autónoma de Querétaro, el cual recibió un tratamiento previo para la precipitación de proteínas, que consistió en subir el pH a 6.0 con NaOH 2N, seguido de un tratamiento térmico a 121 °C por 15 minutos. Para la separación de proteínas el suero fue filtrado en manta de cielo seguido de una centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos a 25°C, el sobrenadante obtenido fue filtrado en papel Whatman número 42. La composición del medio de cultivo fue la siguiente: suero desproteinizado suplementado con 10 g/L de extracto de levadura, 0.5 g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de K_2HPO_4 , MnSO_4 y MgSO_4 , donde se varió la concentración de estos dos últimos. El pH inicial se ajustó a 6.0 con una solución de NaOH al 10%. El medio de cultivo se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.

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) e incubando por 24 h a 37°C. Una vez activada la cepa, se realizó una segunda resiembra transfiriendo una asada al medio de cultivo antes descrito e incubando a 37°C/24 h, por último se hizo una tercera resiembra, transfiriendo 20 µL a medio de cultivo y se incubó por un periodo de 18-20 h para tener al microorganismo en su fase exponencial tardía. 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 fueron incubadas a 37°C/24 h.

5.2. Métodos

5.2.1. Evaluación de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio como suplemento del medio de cultivo sobre el desarrollo de *Lb. casei*

Las cinéticas de crecimiento para *Lb. casei* se llevaron a cabo a una concentración de lactosa en suero lácteo de 50 g/L, con 1% (v/v) de inóculo inicial en fase de crecimiento exponencial tardío, a diferentes concentraciones de sulfato de manganeso (0.015, 0.03, 0.05, 0.1, g/L) y magnesio (0.2, 0.4, 0.6 g/L) (Tabla 4). El experimento se realizó por triplicado en frascos de dilución de 100 mL de capacidad, a un volumen de trabajo de 50, los cuales se incubaron a 37 °C y se incluyó como control negativo 50 mL del medio sin inocular. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo durante 48 h para la determinación de biomasa.

5.2.2. Evaluación de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio como suplemento del medio de cultivo sobre el desarrollo de *Lb. casei*, producción de ácido láctico y consumo de sustrato.

Se seleccionaron las tres suplementaciones de $MnSO_4$ / $MgSO_4$ que mostraron las condiciones más adecuadas para el crecimiento del microorganismo para evaluar la producción de ácido láctico y consumo de sustrato. Para ello se llevaron a cabo fermentaciones a nivel matraz en un proceso tipo lote con un volumen de trabajo de 300 mL del medio de cultivo a temperatura de incubación de 37 °C y 150 rpm. Los matraces fueron inoculados asépticamente con 1% de 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 controló el pH a

6.0 utilizando NaOH 1N. La productividad del proceso fermentativo para la obtención de ácido láctico fue calculada de acuerdo a la formula siguiente:

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

Tabla 4. Concentraciones de sulfato de manganeso y magnesio al medio de cultivo a base de suero lácteo.

Tratamiento	MnSO4 (g/L)	MgSO4 (g/L)
11	0.015	0.2
12	0.015	0.4
13	0.015	0.6
21	0.03	0.2
22	0.03	0.4
23	0.03	0.6
31	0.05	0.2
32	0.05	0.4
33	0.05	0.6
41	0.1	0.2
42	0.1	0.4
43	0.1	0.6

5.2.3. Producción de ácido láctico en fermentación tipo lote

Las fermentaciones, en un proceso tipo lote, se realizaron en un biorreactor de tanque agitado marca Applikon de 7L de capacidad, con un volumen de trabajo de 5L del medio de cultivo a temperatura de incubación de 37°C y 300 rpm. El biorreactor fue inoculado asépticamente con 1% del cultivo de

Lb. casei activado en fase exponencial tardía. Se tomaron muestras del caldo de fermentación a distintos tiempos para el análisis de lactosa, biomasa y ácido láctico, así como para determinar la productividad. Se controló el pH a 6.0 utilizando NaOH 5N.

5.2.4. Evaluación del funcionamiento de membranas de nanofiltración para la separación de ácido láctico del suero fermentado

Se evaluó el funcionamiento de membranas de nanofiltración en la separación del ácido láctico obtenido de la fermentación de suero lácteo. La separación del ácido láctico se realizó en un sistema experimental como el que se muestra en la Figura 10. El sistema consistió de un matraz Erlenmeyer donde fue colocada la solución a separar, un módulo de membrana y una bomba. Se utilizó un módulo de membrana de flujo cruzado con una membrana de nanofiltración (SEPA CF II, Osmonics) con una presión máxima de operación de 1000 psig (6.895 MPa). El área de superficie de la membrana es de 140 cm² y el volumen de retención de la membrana es de 70 mL. Fue utilizada 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, 10 y 20 min). Se probarán dos membranas de nanofiltración, denotadas TFC-SR3 y TFC-SR2 (Tabla 5), diferentes presiones transmembrana, así como diferentes condiciones de pH.

El funcionamiento de las membranas fue evaluado utilizando tres criterios: el flujo de permeado (ecuación 2.1), el rechazo de lactosa (ecuación 2.2) y la recuperación de ácido láctico.

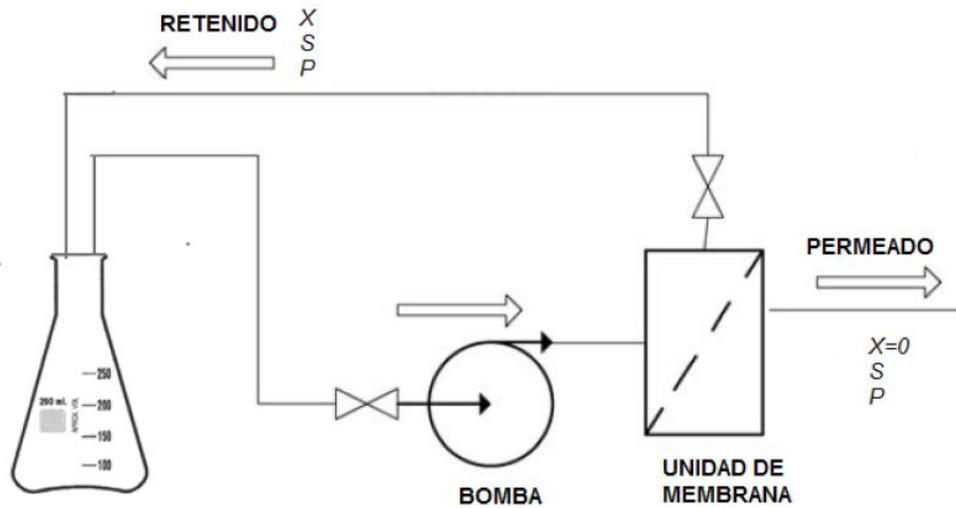


Figura 10. Esquema del sistema experimental para la producción y separación de ácido láctico (X: biomasa, S: sustrato, P: ácido láctico).

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

	Membrana TFC-SR3	Membrana TFC-SR2
Hidrofobicidad	Baja	Media
Tamaño de poro (MWCO)	200	0 – 300
%Retención NaCl	---	10-30
%Retención MgSO ₄	99	97
Material capa superior	Aleación de poliamida	Propiedad de TFC
Rango de pH	2 -10	2 – 9
Aplicaciones	Separación de azúcares y proteínas. Desalación	Separación de iones multivalentes y compuestos de alto peso molecular y de la solución

5.3. Técnicas analíticas

5.3.1. Cuantificación de lactosa por el método de Dubois

Las concentraciones de lactosa, para la preparación del medio de cultivo a base de suero de leche, fueron determinadas por medio del método fenol-sulfúrico o método de Dubois, el cual fue propuesto por Dubois *et al.*, en 1956. Se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensible a ácidos fuertes y altas temperaturas; bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar generando varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos, los cuales pueden ser medidos espectrofotométricamente, donde a mayor color se tiene mayor concentración del azúcar medido. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón. El método se describe con mayor detalle en el apéndice A.

5.3.2. 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) operado a 45°C, acoplado a un detector de índice de refracción mantenido a 35°C y controlado por el software Agilent ChemStation. La fase móvil fue H₃PO₄ al 0.1% a un flujo de 0.8 ml/min. 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 sobrenadante fue filtrado en filtros de celulosa Agilent de 0.45µm.

5.3.3. 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.

5.3.4. Determinación de cloruros, fosfatos y sulfatos del permeado.

La determinación de cloruros, fosfatos y sulfatos del permeado se realizó según lo establecido en los métodos oficiales de análisis de la AOAC de 2002 y por Cuartas-Urbe en 2005.

5.4. Desarrollo del modelo matemático

La modelación del proceso de producción de ácido láctico fue basada en ecuaciones diferenciales propuestas por Altiok en 2004, ecuaciones (2) (6) y (7), quien estudió la producción de ácido láctico por fermentación de suero lácteo utilizando *Lb. casei*. Dichas ecuaciones permiten estudiar el crecimiento de la biomasa, la formación del producto y la utilización del 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 el cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ y K_s (1) fue necesario realizar un experimento en donde se varió la concentración inicial de sustrato (10, 20, 30, 40, 50 y 60 g/L de lactosa) y los otros factores del medio se mantuvieron constantes para poder observar las características de la velocidad de crecimiento del microorganismo a diferentes concentraciones de sustrato. Una vez obtenidas las velocidades de crecimiento (7) se aplicó un ajuste no lineal de la ecuación de Monod (Figura 11) mediante el programa estadístico JMP 5.0.1 para obtener la estimación de parámetros.

$$\mu = \frac{\ln X(t) - \ln X(t_0)}{t - t_0} \quad (7)$$

Los coeficientes de rendimiento de biomasa y producto con respecto al sustrato fueron definidos como los coeficientes estequiométricos. El rendimiento de la biomasa fue calculado como la biomasa producida por el sustrato utilizado (8). El rendimiento de producto fue definido como el producto producido por el sustrato utilizado (9). El coeficiente de mantenimiento celular se define como el sustrato necesario para el mantenimiento de ciertas funciones específicas del microorganismo, aunque el crecimiento sea nulo a través del tiempo y fue tomado de la literatura con el valor de 0.065 g de sustrato / g de biomasa por hora. Alfa y beta son los coeficientes de formación de producto asociado y no asociado al crecimiento y fueron definidos según las ecuaciones (10) y (11)

$$Y_{XS} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (8)$$

$$Y_{PS} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (9)$$

$$\alpha = \frac{Y_{PS}}{Y_{XS}} \quad (10)$$

$$\beta = \frac{Y_{PS}}{m_s} \quad (11)$$

Una vez estimados los parámetros se verificó que el modelo propuesto, así como los parámetros determinados, se ajustaron a las cinéticas obtenidas experimentalmente.

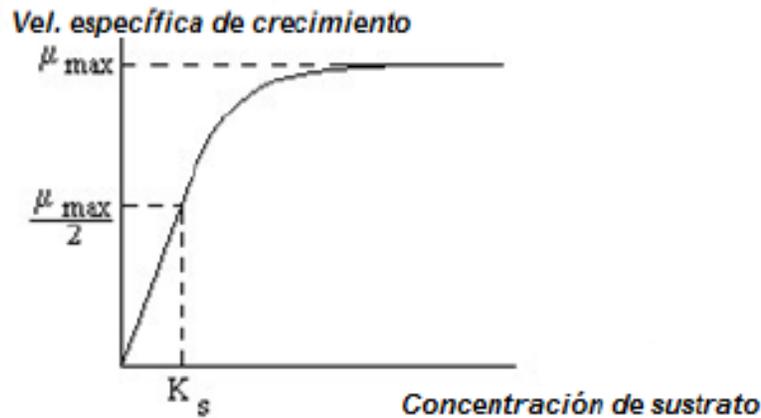


Figura 11. Cinética de Monod

5.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño experimental bifactorial completamente al azar con tres repeticiones para evaluar las mejores condiciones de crecimiento de *Lb. casei* en suero lácteo. Los factores de estudio fueron la concentración de sulfato de manganeso (0.015, 0.03, 0.05, 0.1 g/L) y sulfato de magnesio (0.2, 0.4, 0.6 g/L) con tres repeticiones. Así mismo para encontrar las mejores condiciones de separación del ácido láctico a partir del caldo de fermentación de suero lácteo con *Lb. casei*, se partió de un diseño experimental completamente al azar con dos repeticiones. El diseño de tratamientos fue tetrafactorial, los factores de estudio fueron: pH del caldo de fermentación (ej., pH 2.5, 3.5 y 5), presión transmembrana (ej., 150 y 300 psig / 2.068 y 1.034 MPa), tiempo de filtrado (ej., 5, 20 y 40 minutos), así como el tipo de membrana.

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

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación del efecto de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio sobre el crecimiento de *Lb. casei*.

Se llevó a cabo la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sulfato de manganeso y magnesio (Tabla 5) para determinar las condiciones de suplementación adecuadas para el desarrollo de *Lb. casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo.

Las curvas de crecimiento del *Lb. casei* obtenidas a partir de las diferentes suplementaciones se muestran en las Figuras 12 y 13. Se puede apreciar como el comportamiento del microorganismo es similar en todas las condiciones de suplementación; presentando una fase de adaptación rápida, como consecuencia de la adecuación previa del inóculo al medio, después de la cual el microorganismo crece exponencialmente hasta llegar a una fase de desaceleración en la tasa de crecimiento a partir de la hora 24. Sin embargo, según el análisis estadístico ($p < 0.001$), el factor que influye en el crecimiento del microorganismo [velocidad de crecimiento en la fase exponencial del microorganismo (μ_e)] y por tanto en el incremento de la población a las 24 horas (ΔX_{24}) es la concentración de sulfato de manganeso. Obteniendo mayores μ_e y ΔX_{24} al adicionar entre 0.03 - 0.05 g/L de sulfato de manganeso no importando la concentración de $MgSO_4$.

En la Tabla 6 se reportan los valores de la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial así como el incremento de la biomasa a las 24 horas de fermentación, a cada una de las condiciones estudiadas. El mayor valor de μ_e y ΔX_{24} fue 0.110 g/Lh y 3.091 g/L, respectivamente, con la suplementación 0.03/0.4 g/L de $MnSO_4/MgSO_4$; en la cual *Lb. casei* presenta una fase lag más corta, es decir una mejor adecuación del microorganismo al medio lo cual proporciona mejores condiciones de crecimiento y con ello se esperaría mayor producción de ácido láctico.

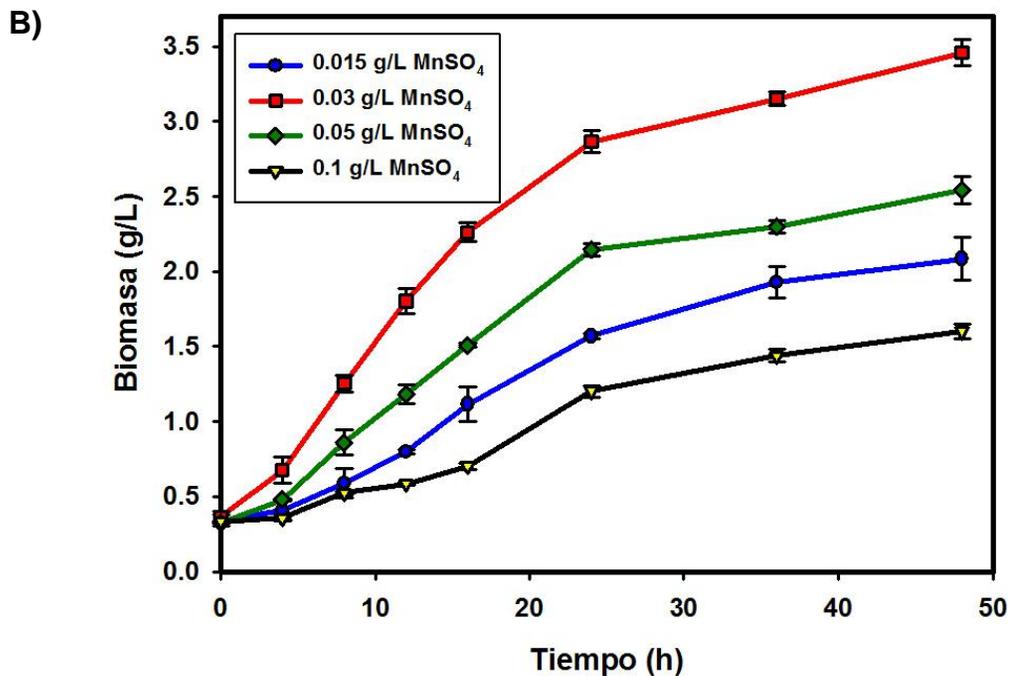
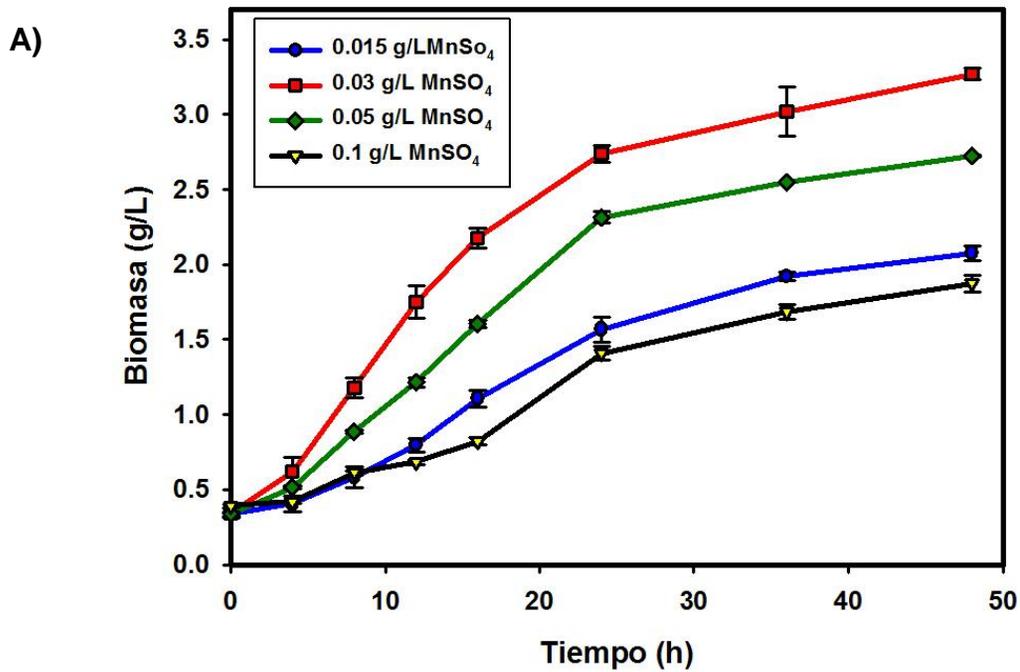


Figura 12 Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo con 0.2 (A) y 0.4 (B) g/L de MgSO₄ y diferentes concentraciones de MnSO₄ (0.015, 0.03, 0.05 y 0.1 g/L) como suplemento.

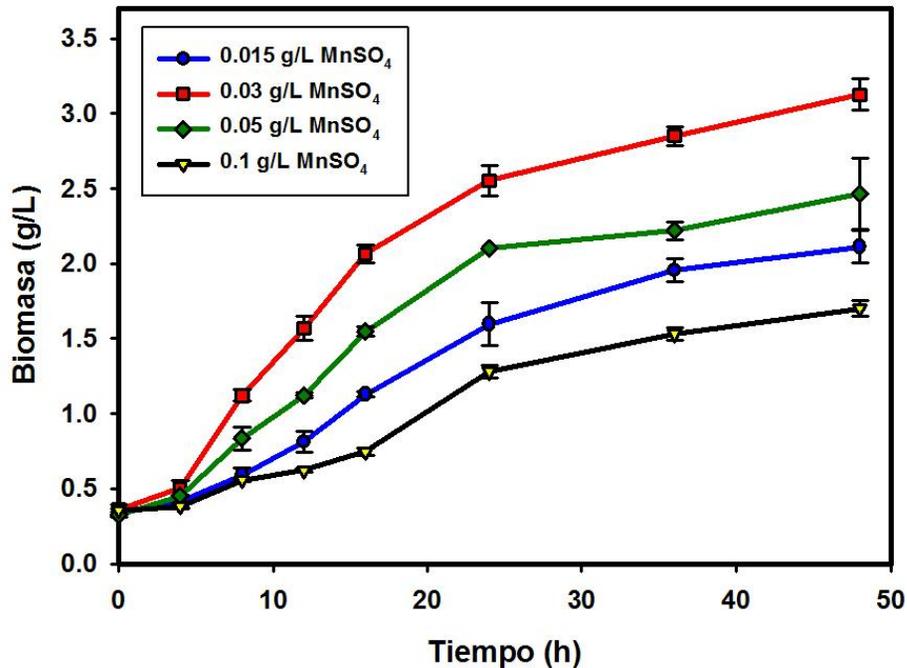


Figura 13. Curvas de crecimiento de *Lactobacillus casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo con 0.6 g/L de MgSO₄ y diferentes concentraciones de MnSO₄ (0.015, 0.03 0.05 y 0.1 g/L) como suplemento.

Por otro lado, con la suplementación 0.05/0.2 g/L MnSO₄/MgSO₄, aunque presenta una fase ligeramente mayor que con 0.03/0.04, el comportamiento de la bacteria es muy similar (diferencia no significativa, $p < 0.01$), obteniendo condiciones de crecimiento adecuadas y con ello mayor producción de biomasa en menor tiempo, alcanzando un máximo de 2.546 g/L de biomasa a las 24 horas de fermentación.

La suplementación de suero lácteo para la producción de ácido láctico ha sido estudiada por múltiples autores. Fitzpatrick *et al.* en 2010, reportaron que la adición de MnSO₄·4H₂O a una concentración de 0.01 g/L en un medio de cultivo a base de suero lácteo disminuye el tiempo de fermentación del *Lb. casei* considerablemente (de 120 a 52 h), además que reduce la concentración de extracto de levadura requerido (de 2 a 1.5 % p/v) manteniendo una alta conversión de lactosa a ácido láctico (90%) con una población máxima de 3.5 g/L de biomasa

a las 36 h de fermentación. Los resultados anteriores son similares a los obtenidos en el presente trabajo, dado que a concentraciones entre 0.05-0.03 g/L de MnSO_4 se obtiene aproximadamente 2.2-2.8 g/L de biomasa. Sin embargo el tiempo de fermentación es considerablemente menor de 24 h, empleando concentraciones de 1% p/v de extracto de levadura.

Alonso *et al.*, en 2010 estudiaron el crecimiento de *Lb. casei* ATCC 393 en un medio a base de yogurt caducado suplementado con 2.5 g/L de extracto de levadura sin adición de MnSO_4 ni MgSO_4 , alcanzando una biomasa máxima de 0.9 g/L a las 34 h. Estos resultados son comparables con los obtenidos al suplementar el medio con 0.015 y 0.1 g/L de MnSO_4 obteniendo concentraciones de biomasa entre 0.95 a 1.42 g/L a las 24 h de fermentación. De este estudio como del anterior se observa que es necesaria la adición de estas sales para disminuir el tiempo de fermentación así como para favorecer el adecuado crecimiento del microorganismo y con ello la producción de ácido láctico.

Por lo tanto, se decidió probar las condiciones de suplementación 0.03 y 0.05 g/L de MnSO_4 con 0.2 g/L de MgSO_4 a nivel matraz para cuantificar la producción de ácido láctico y consumo de sustrato en la siguiente etapa experimental, además de las condiciones propuestas por Ríos en el 2011, con las cuales, aunque se obtiene una biomasa máxima de 1.15 g/L a las 28 horas de fermentación, se logra una alta conversión de lactosa a ácido láctico (84%).

Tabla 6. Velocidad de crecimiento de *Lb. casei* en fase exponencial (μ_e) e incremento de biomasa a las 24 horas de fermentación (ΔX_{24}) en un medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de manganeso (0.015, 0.03, 0.05 y 0.1 g/L) y magnesio (0.2, 0.4 y 0.6 g/L).

MnSO4 (g/L)	MgSO4 (g/L)	μ_e (g/Lh)	ΔX_{24} (g/L)
0.015	0.2	0.059 ^a (0.006)	1.735 ^a (0.077)
0.015	0.4	0.059 ^a (0.003)	1.743 ^a (0.135)
0.015	0.6	0.061 ^a (0.008)	1.766 ^a (0.127)
0.03	0.2	0.106 ^b (0.006)	2.927 ^b (0.057)
0.03	0.4	0.110 ^b (0.002)	3.091 ^b (0.072)
0.03	0.6	0.102 ^b (0.004)	2.766 ^b (0.074)
0.05	0.2	0.090 ^{bc} (0.002)	2.384 ^c (0.014)
0.05	0.4	0.083 ^c (0.002)	2.214 ^c (0.085)
0.05	0.6	0.083 ^c (0.001)	2.141 ^c (0.0228)
0.1	0.2	0.047 ^d (0.002)	1.482 ^d (0.066)
0.1	0.4	0.041 ^d (0.002)	1.265 ^d (0.056)
0.1	0.6	0.043 ^d (0.002)	1.346 ^d (0.060)

Promedios con diferente letra indica diferencia significativa ($p < 0.05$).
Promedio y (desviación estándar), $n = 3$.

6.2. Evaluación del efecto de la concentración de sulfato de manganeso y magnesio sobre el crecimiento de *Lb. casei*, producción de ácido láctico y consumo de sustrato.

Para determinar el efecto de la suplementación de sulfato de manganeso y magnesio sobre la producción de biomasa y ácido láctico, así como de consumo de sustrato, se tomaron como base las mejores condiciones establecidas en la etapa anterior en una fermentación tipo lote a nivel matraz, durante la cual se tomaron muestras cada dos horas.

Las cinéticas de consumo de sustrato, producción de biomasa y ácido láctico se presentan en las Figuras 14 y 15. En la cinética de producción de biomasa (Figura 14A) se puede apreciar un comportamiento similar para las tres suplementaciones durante las primeras 12 horas de fermentación, sin embargo con la suplementación 0.03/0.2 el crecimiento es significativamente mayor. A partir de la hora 14, la velocidad de crecimiento aumenta considerablemente en dicha condición y, en menor proporción, en la fermentación 0.05/0.2, obteniendo un máximo de biomasa a las 24 horas fermentación de 1.928 y 1.482 respectivamente, mientras que el crecimiento estudiado a mayor concentración de $MgSO_4$ (0.05/0.5) alcanza un valor máximo de 1.258. Esto confirma los resultados antes mostrados, logrando escalar a un volumen la fermentación sin afectar el crecimiento de *Lb. casei*.

Los valores obtenidos de biomasa en este trabajo son semejantes a los obtenidos por Ríos en 2011, quien bajo las mismas condiciones de suplementación 0.05/0.5, logró una producción de biomasa máxima de 1.15 g/L a las 24 horas de fermentación. Otros autores como Amrane *et al.* (2005) y Fajardo *et al.* (2008), quienes trabajaron con suero lácteo desproteinizado y cepas de *Lb. casei*, reportan valores máximos de biomasa 1.5 – 2 g/L logrados al final de la fermentación (32 horas), los cuales son similares a los obtenidos en el presente estudio.

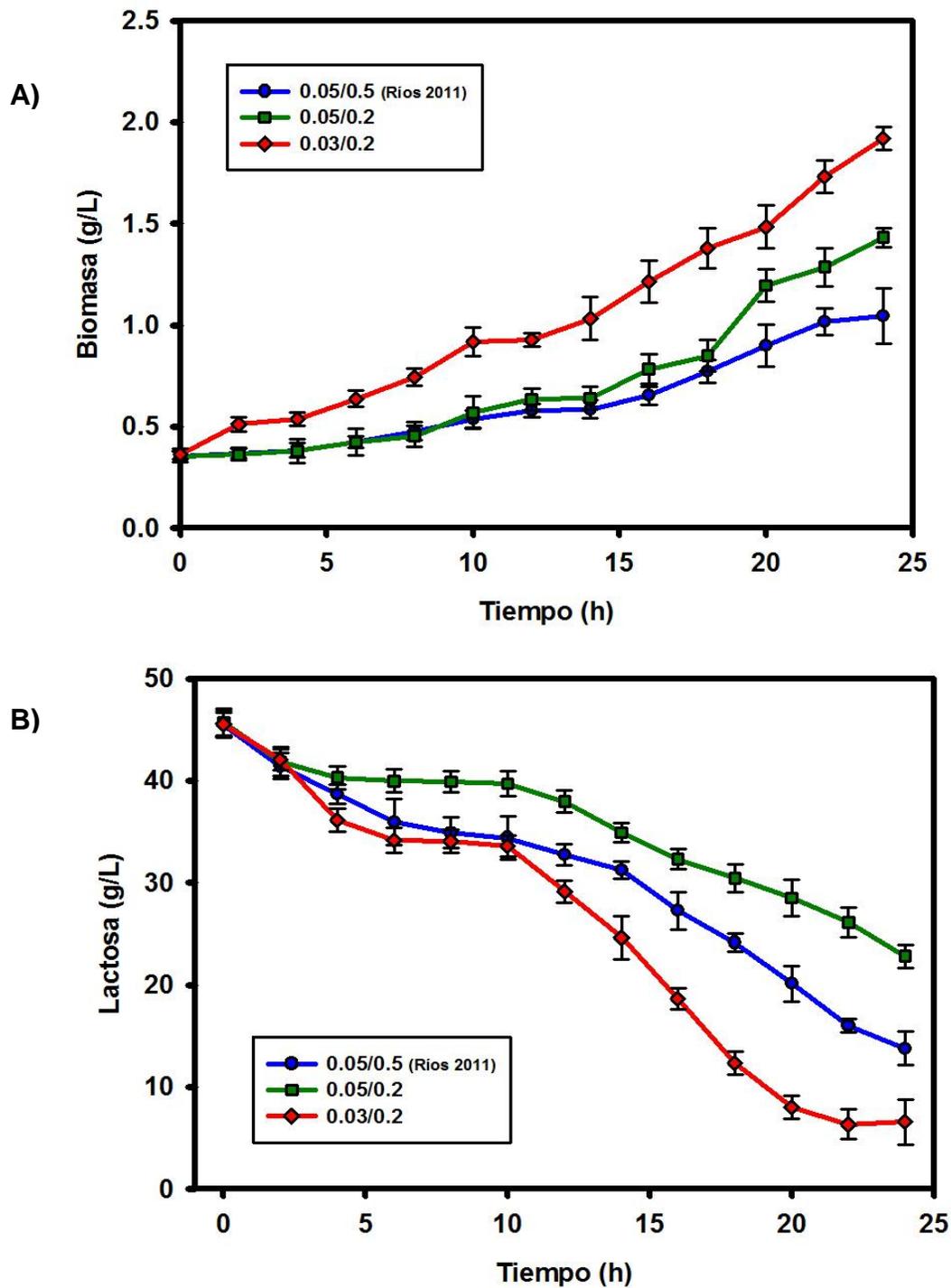


Figura 14. Cinéticas de producción de biomasa (A) y consumo de sustrato (B) de *Lactobacillus casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo bajo condiciones de suplementación: 0.05/0.5, 0.05/0.2 y 0.03/0.2 g/L de $MnSO_4/MgSO_4$ respectivamente, en un proceso tipo lote.

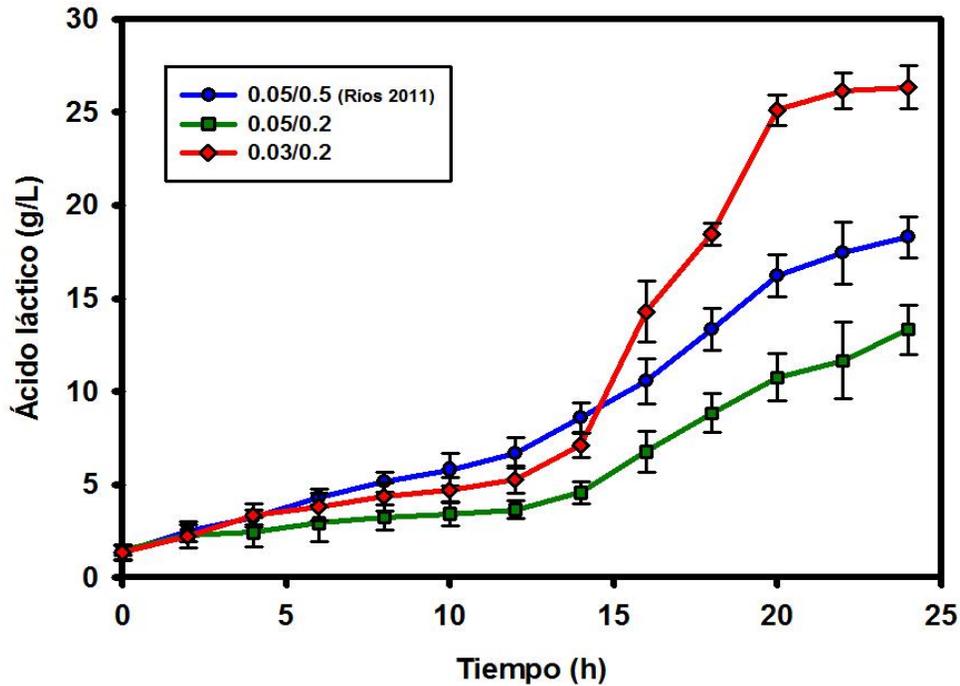


Figura 15. Cinéticas de producción de ácido láctico por *Lactobacillus casei* en un medio de cultivo a base de suero lácteo bajo condiciones de suplementación: 0.05/0.5, 0.05/0.2 y 0.03/0.2 g/L de $\text{MnSO}_4/\text{MgSO}_4$ respectivamente.

Por otro lado, las cinéticas de consumo de sustrato (Figura 14B) muestran que, la mayor disminución de lactosa se consiguió con la suplementación 0.03/0.2, consumiendo alrededor del 85.5 % del sustrato inicial, es decir que, al cabo de 24 horas de fermentación la concentración de lactosa fue de 45.607 ± 1.315 a 6.586 ± 2.226 g/L; lo cual concuerda con el mayor crecimiento microbiano para esta misma condición de suplementación. Por otro lado, el consumo de lactosa disminuye solamente de 45.495 ± 1.171 a 13.802 ± 1.641 g/L con la suplementación 0.05/0.5, lo cual representa un 69.61 % de sustrato consumido y de 45.741 ± 1.302 a 22.820 ± 1.151 g/L con la suplementación 0.05/0.2, correspondiente a un consumo de sustrato de 50.05 %. Los resultados anteriores son similares a los encontrados por Ríos en 2011, quien con una suplementación de 0.05/0.5 g/L de $\text{MnSO}_4/\text{MgSO}_4$ reporta un consumo de sustrato del 72%.

Con respecto a los resultados obtenidos relacionados a la producción de ácido láctico (Figura 15), se puede observar una tendencia similar en todas las condiciones de estudio, donde en las primeras 14 horas de fermentación no se observa una producción de ácido láctico importante, sin embargo, transcurrido este tiempo la generación de ácido láctico comienza a aumentar de manera notable para la condición 0.03/0.2, ascendiendo de manera lineal hasta la hora 20, mientras que, para las condiciones 0.05/0.5 y 0.05/0.2 el aumento en la tasa de producción no es tan marcada, por lo que la generación de ácido láctico sigue en aumento a las 24 horas de fermentación. De esta manera, la mayor producción de ácido láctico se alcanzó con la suplementación 0.03/0.2 de 26.350 ± 1.172 g/L a las 24 horas de fermentación con una tasa de producción o productividad máxima de 2.911 g/Lh alcanzada entre las horas 14 a 20 de fermentación; mientras que con la suplementación 0.05/0.5 y 0.05/0.2 se obtuvo una concentración máxima de ácido láctico a las 24 horas de fermentación de 18.297 ± 1.096 y 13.331 ± 1.319 g/L con productividades máximas de 1.281 y 1.031 g/Lh respectivamente, logradas entre las horas 14 a 20 de fermentación.

En general, la suplementación que proporciona las mejores condiciones tanto para el crecimiento del *Lb. casei*, así como para la producción de ácido láctico y el consumo de sustrato (Tabla 7), es la compuesta por 0.03 g/L de $MnSO_4$ y 0.2 g/L de $MgSO_4$, logrando resultados tanto de productividad como de consumo de sustrato similares a los obtenidos por Ding y Tan, en 2006 (0.55 g/Lh y 73% respectivamente), quienes trabajaron con *Lb. casei* inmovilizada, en un medio de cultivo en base de suero lácteo suplementado con extracto de levadura. Cabe mencionar que los resultados obtenidos con la suplementación 0.05/0.5, con respecto a la producción de ácido láctico, no fueron los esperados, Ríos en el 2011 reportó que la producción lograda, bajo las mismas condiciones que en el presente trabajo, a las 21 horas de fermentación, es de 25.01 g/L con una productividad máxima de 2.08 g/Lh, por lo que se esperaban valores similares a éstos. La baja producción de ácido láctico se atribuye a que la alta concentración de sulfato de magnesio, es un factor limitante en el crecimiento del

microorganismo ocasionando un mayor consumo de sustrato para mantenimiento celular, lo cual da como resultado una incompleta fermentación a las 24 horas del proceso.

Tabla 7. Características de la producción de ácido láctico mediante la fermentación de suero lácteo desproteínizado suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de manganeso (0.03, 0.05 g/L) y magnesio (0.2 y 0.5 g/L) por *Lb. casei* a las 24 horas de fermentación. (P: ácido láctico, S: lactosa y X: biomasa).

Suplementación (MnSO₄/MgSO₄ g/L)	0.05/0.5	0.05/0.2	0.03/0.2
Ácido láctico (g/L)	18.297 ^a (1.096)	13.331 ^b (1.319)	26.350 ^c (1.172)
Productividad máx. (g/Lh)	1.281 ^a (0.082)	1.031 ^a (0.166)	2.911 ^b (0.032)
Biomasa (g/L)	1.046 ^a (0.135)	1.433 ^b (0.047)	1.920 ^c (0.056)
Consumo de lactosa (%)	69.609 ^a (4.116)	50.053 ^b (3.605)	85.513 ^c (5.100)
Y _{P/S} (g/L de P / g/L de S)	0.536 ^a (0.064)	0.522 ^a (0.091)	0.643 ^a (0.059)
Y _{X/S} (g/L de X / g/L de S)	0.022 ^a (0.004)	0.047 ^b (0.004)	0.040 ^b (0.005)

Promedios con diferente letra indica diferencia significativa (p<0.05).
Promedio y (desviación estándar), n=3.

Diversos autores han estudiado la producción de ácido láctico por medio de la fermentación de medios suplementados con múltiples compuestos. Amrane en 2005 evaluó la producción de ácido láctico por fermentación de suero lácteo ultrafiltrado suplementado con extracto de levadura, peptona de caseína pancreática y tween 80 (20, 5 y 1 g/L respectivamente), encontrando una

producción máxima de ácido láctico de 37.5 g/L y biomasa de 3.1 g/L a las 32 horas de proceso. Estos resultados son mayores a los encontrados en el presente trabajo debido a que cuentan con una suplementación rica en aminoácidos y otros compuestos que proporcionan mejores condiciones para la producción de ácido láctico, sin embargo el tiempo de fermentación es mayor al igual que los costos de suplementación.

Por su parte Nancib *et al.*, en 2009 investigaron la producción de ácido láctico usando como sustrato extracto de dátil suplementado con extracto de levadura, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y MgSO_4 con y sin MnSO_4 y *Lb. casei* como microorganismo en una fermentación tipo lote, quienes encontraron tendencias similares a las nuestras, ya que reportan un valor máximo de ácido láctico de 53 g/L con una productividad máxima de 2.7 g/Lh y 90% de sustrato consumido (glucosa y fructosa) para la fermentación con MnSO_4 a las 19 horas iniciado el proceso, y de 37 g/L a una tasa máxima de 0.98 g/Lh y 78 % de consumo de sustrato para la fermentación sin MnSO_4 también a las 19 h, mientras que en el presente trabajo se lograron valores menores a las 24 horas de fermentación; sin embargo, estos resultados demuestran la importancia de la adición de MnSO_4 en la fermentación por *Lb. casei*.

Büyükkileci y Harsa en 2004 estudiaron el crecimiento de *Lb. casei* (NRRL B-441) en un medio a base de suero lácteo suplementado con 5 g/L de extracto de levadura, y diversas sales como K_2HPO_4 (0.5 g/L), KH_2PO_4 (0.5 g/L), MgSO_4 (0.2 g/L) y MnSO_4 (0.05 g/L), obteniendo valores de consumo de sustrato y producción de ácido láctico menores a las 24 horas de fermentación, cuando el medio no es suplementado con MnSO_4 al igual que cuando no se adiciona ninguna sal; por lo que, podemos concluir que solamente el MnSO_4 es esencial en la fermentación de suero lácteo para la producción de ácido láctico por *Lb. casei*, debido a que el ion Mn^{+2} tiene un rol importante en el metabolismo del microorganismo como el cofactor de la enzima lactato deshidrogenasa.

6.3. Análisis de las cinéticas de consumo de sustrato, formación de biomasa y producto bajo las condiciones de suplementación establecidas en un proceso tipo lote

La Figura 16 presenta los perfiles bajo la condición 0.03/0.2, de formación de biomasa, consumo de lactosa y producción de ácido láctico de *Lb. casei* en un medio a base de suero lácteo desproteínizado y suplementado. Pueden ser identificadas tres fases que corresponden a las diferentes etapas en la fermentación: a) fase lag extendida (primeras 12 horas), b) fase de alta producción de ácido láctico asociada al crecimiento microbiano (12-21 horas) y c) fase estacionaria, donde prácticamente cesa la producción de ácido láctico y formación de biomasa (21-24 horas).

Durante la primera fase (fase lag) se logra apreciar una tasa en el consumo de sustrato y formación de biomasa menor a las observadas en las otras fases, así como una producción de ácido láctico casi nula con una productividad de 0.385 ± 0.019 g/Lh (Tabla 8). Esto puede ser debido a que al inicio del metabolismo bacteriano, la lactosa es transportada al interior de la célula, donde se descompone en dos azúcares glucosa y galactosa, los cuales serán convertidos en ácido láctico a través de la glucólisis o la vía de la tagatosa respectivamente, para lo cual es necesario 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 y conversión de los azúcares; además, la célula utiliza la mayor parte de la energía generada para el transporte de la lactosa, lo que ocasiona un consumo lento del sustrato y un crecimiento microbiano pausado al inicio de la fermentación. Asimismo la tasa de hidrólisis de la lactosa es mucho mayor a la tasa de conversión de la glucosa o la galactosa a ácido láctico por lo que la producción de ácido láctico es casi nula. Alvarez *et al.*, en el 2010 reportan fases lag en el rango de 5-10 h, encontrando una relación inversa entre la duración de la fase y la concentración de inóculo inicial, además que al añadir lactasa al inicio de la fermentación la fase lag

disminuye considerablemente, lo que sugiere que la duración de la fase lag, en este caso, es el tiempo de adaptación requerido por el inóculo de *Lb. casei* para adaptar adecuadamente su sistema enzimático para la hidrólisis de la lactosa. Schepers *et al.*, en 2012 estudiaron el crecimiento de *Lb. helveticus* y la producción de ácido láctico en un medio a base de suero lácteo permeado y suplementado con extracto de levadura con un inóculo inicial de 1%, ellos reportaron fases de adaptación similares a las encontradas en el presente trabajo, lo que sugiere que la concentración del inóculo inicial está relacionada con el tiempo de adaptación, tal como proponían Alvarez *et al.*, en 2010.

Tabla 8. Productividad de ácido láctico y rendimiento de producción de ácido láctico ($Y_{P/S}$) y biomasa ($Y_{X/S}$) con respecto al consumo de sustrato en las diferentes etapas de la fermentación.

Fase de fermentación	1	2	3
Productividad (g/Lh)	0.385 (0.019)	2.685 (0.030)	0.427 (0.218)
$Y_{P/S}$ (g/L de P / g/L de S)	0.261 (0.017)	0.995 (0.012)	0.164 (0.014)
$Y_{X/S}$ (g/L de X / g/L de S)	0.064 (0.002)	0.063 (0.006)	0.058 (0.005)

Promedios con diferente letra indica diferencia significativa ($p < 0.05$). Promedio y (desviación estándar), $n=3$.

En la segunda etapa de fermentación, se aprecia una alta producción de ácido láctico, así como un crecimiento bacteriano exponencial y un mayor consumo de sustrato. Esto es debido posiblemente a que la bacteria ya adecuó el sistema enzimático, tanto para la hidrólisis de la lactosa como para la conversión de los azúcares a ácido láctico, y ambas tasas, de conversión e hidrólisis, se

igualan. De esta manera la producción de ácido láctico es notablemente mayor a partir de la hora 12 de fermentación y su producción continúa hasta el final de la segunda fase (20-21 horas), logrando una productividad de ácido láctico y un rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$) máximos de 2.685 ± 0.030 g/Lh y 0.995 g/g respectivamente. Mientras tanto, la formación de biomasa sigue una tendencia en aumento constante hasta cerca de la hora 20, después de este tiempo el crecimiento de la bacteria comienza a detenerse con lo que da inicio la fase estacionaria.

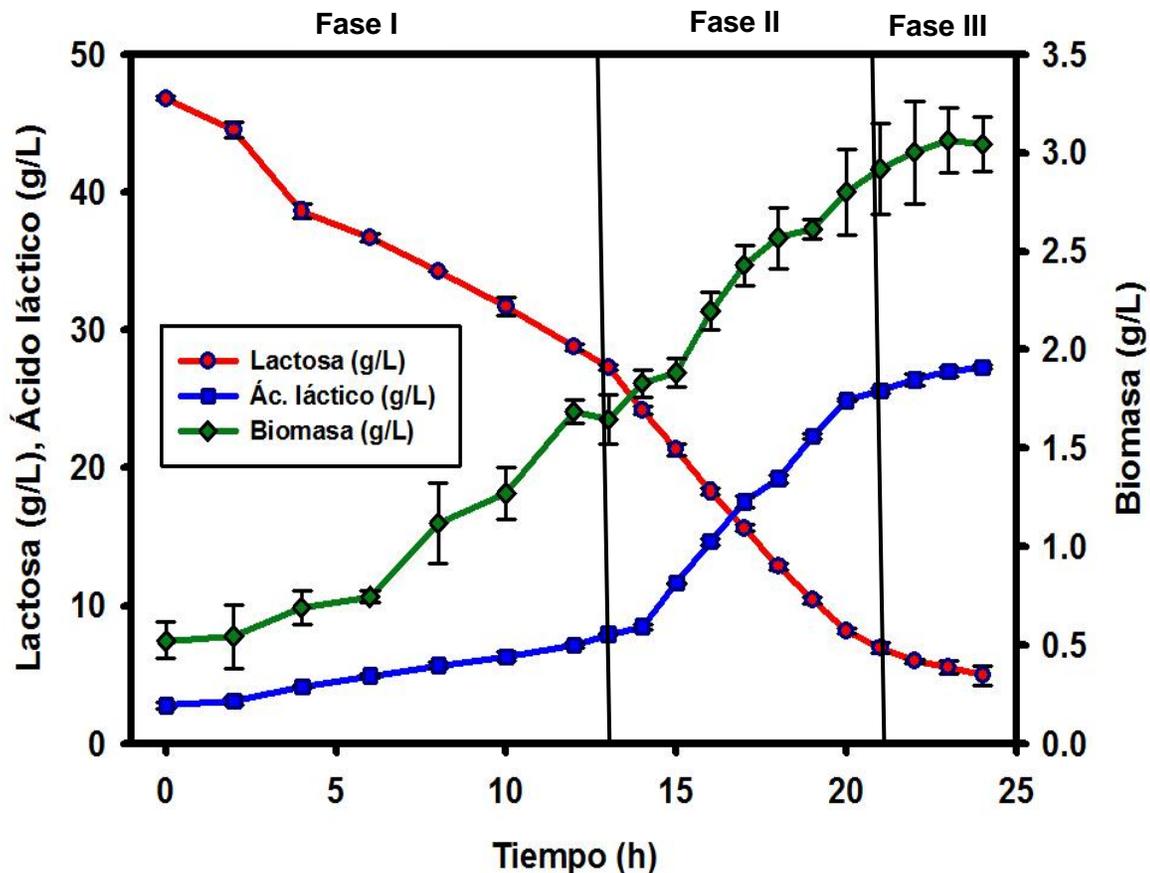


Figura 16. Perfil de la formación de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácido láctico bajo condiciones de suplementación de $0.03/0.2$ g/L de $MnSO_4/MgSO_4$ en un proceso de fermentación tipo lote por *Lb. casei*.

Durante la última etapa de fermentación o fase estacionaria, la producción de ácido láctico y la formación de biomasa decrecen considerablemente, además de que el sustrato es consumido casi en su totalidad (alrededor del 90%); alcanzando una concentración de 27.321 ± 0.139 g/L de ácido láctico y de 3.043 g/L de biomasa, a las 24 horas de fermentación. Esta disminución en la tasa de producción es debido a que el medio ya no cuenta con los nutrientes necesarios para un adecuado crecimiento y por ende, generación de producto. Burgos-Rubio *et al.*, en 2010 estudiaron el crecimiento de *Lb. casei* en suero lácteo permeado y suplementado con extracto de levadura, en el cual monitorearon la concentración de galactosa y glucosa en el medio, ellos reportan que al final de la fermentación hay un consumo de lactosa y glucosa del 95%, mientras que la galactosa sólo es consumida en un 65%, lo cual indica una mayor afinidad por la glucosa que por galactosa en el metabolismo de *Lb. casei*, además que la acumulación de galactosa al final de la fermentación inhibe el crecimiento microbiano al tener bajas concentraciones de lactosa. Resultados similares son reportados por Alvarez *et. al.*, en 2010, alcanzando una producción de ácido láctico y consumo de sustrato similar a la encontrada en el presente trabajo a las 24 horas de fermentación. Estos resultados pueden indicar que, a las 21 horas de proceso, aunque hay lactosa en el medio, el metabolismo de la bacteria es inhibido por acción de la galactosa acumulada; sin embargo es posible obtener una importante producción de ácido láctico.

6.4. Desarrollo del modelo matemático

6.4.1. Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos fueron determinados de acuerdo a los métodos descritos en la sección 5.4 a partir de las concentraciones de biomasa, ácido láctico y lactosa obtenidos experimentalmente. Éstos son presentados en las Tabla 9, el valor de m_s fue tomado de la bibliografía como 0.065 g de biomasa / g de sustrato por hora.

Los datos de las velocidades específicas obtenidas a partir de la ecuación (7) a diferentes concentraciones de sustrato inicial, muestran una cinética típica de Monod (Figura 17). Sin embargo, para determinar los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_s , se buscó una ecuación que lograra un mejor ajuste de los datos, lo cual fue logrado linealizando la ecuación de Monod empleando dos métodos: Método de Lineweaver-Burk, en el cual se usa la doble recíproca (12) mostrando su ajuste en la Figura 18A y método de Augustinsson, en el cual la ecuación de Lineweaver-Burk se multiplica por S_0 (13) mostrando su ajuste en la Figura 18B. Los resultados muestran que la ecuación de Augustinsson presenta un mejor ajuste de los datos, obteniendo valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_s de 0.152 h^{-1} y 4.666 g/L respectivamente, cabe destacar que estos valores son menores a los estimados con la ecuación de Lineweaver – Burk (Tabla 10).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S_0} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (12)$$

$$\frac{S_0}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \cdot S_0 \quad (13)$$

Tabla 9. Parámetros cinéticos basados en la concentración inicial de sustrato (S_0)

S_0 (g/L)	μ (h^{-1})	Y_{xs}	Y_{ps}	α	β (h^{-1})	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)
10	0.099 (0.009)	0.081 (0.005)	0.485 (0.052)	6.000 (0.549)	0.032 (0.003)	1.136 (0.060)
20	0.130 (0.001)	0.076 (0.002)	0.527 (0.065)	6.941 (0.811)	0.034 (0.004)	1.540 (0.052)
30	0.133 (0.003)	0.076 (0.003)	0.562 (0.052)	7.434 (0.466)	0.037 (0.003)	2.177 (0.124)
40	0.138 (0.002)	0.069 (0.001)	0.576 (0.048)	8.404 (0.576)	0.037 (0.003)	2.761 (0.186)
50	0.139 (0.001)	0.066 (0.002)	0.592 (0.008)	8.945 (0.241)	0.038 (0.001)	2.928 (0.151)
60	0.139 (0.001)	0.063 (0.002)	0.581 (0.015)	9.222 (0.251)	0.038 (0.001)	3.029 (0.071)

Promedio y (desviación estándar), n=3

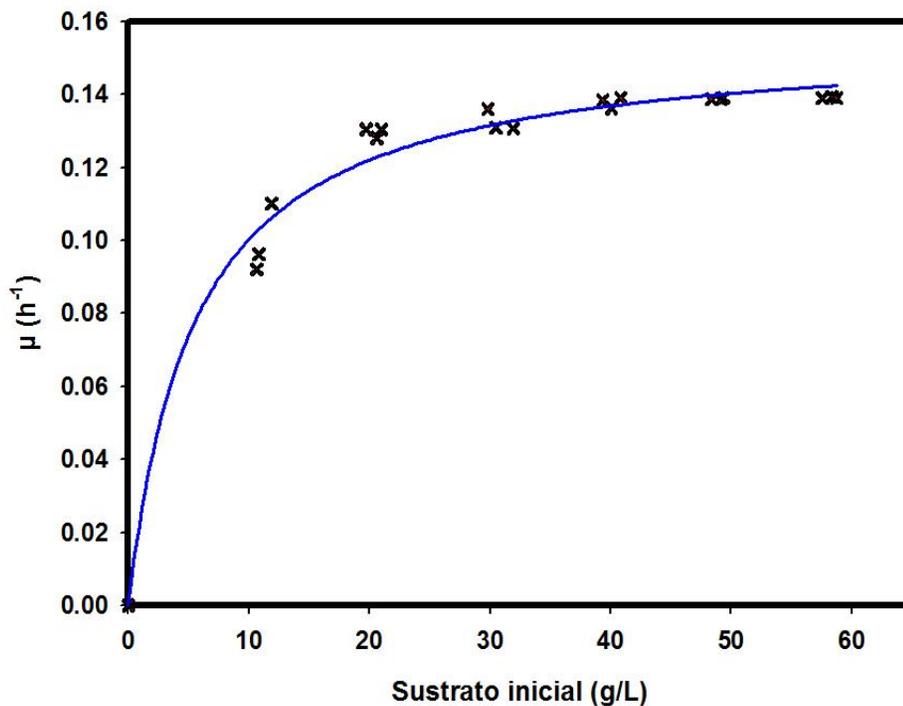


Figura 17. Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod

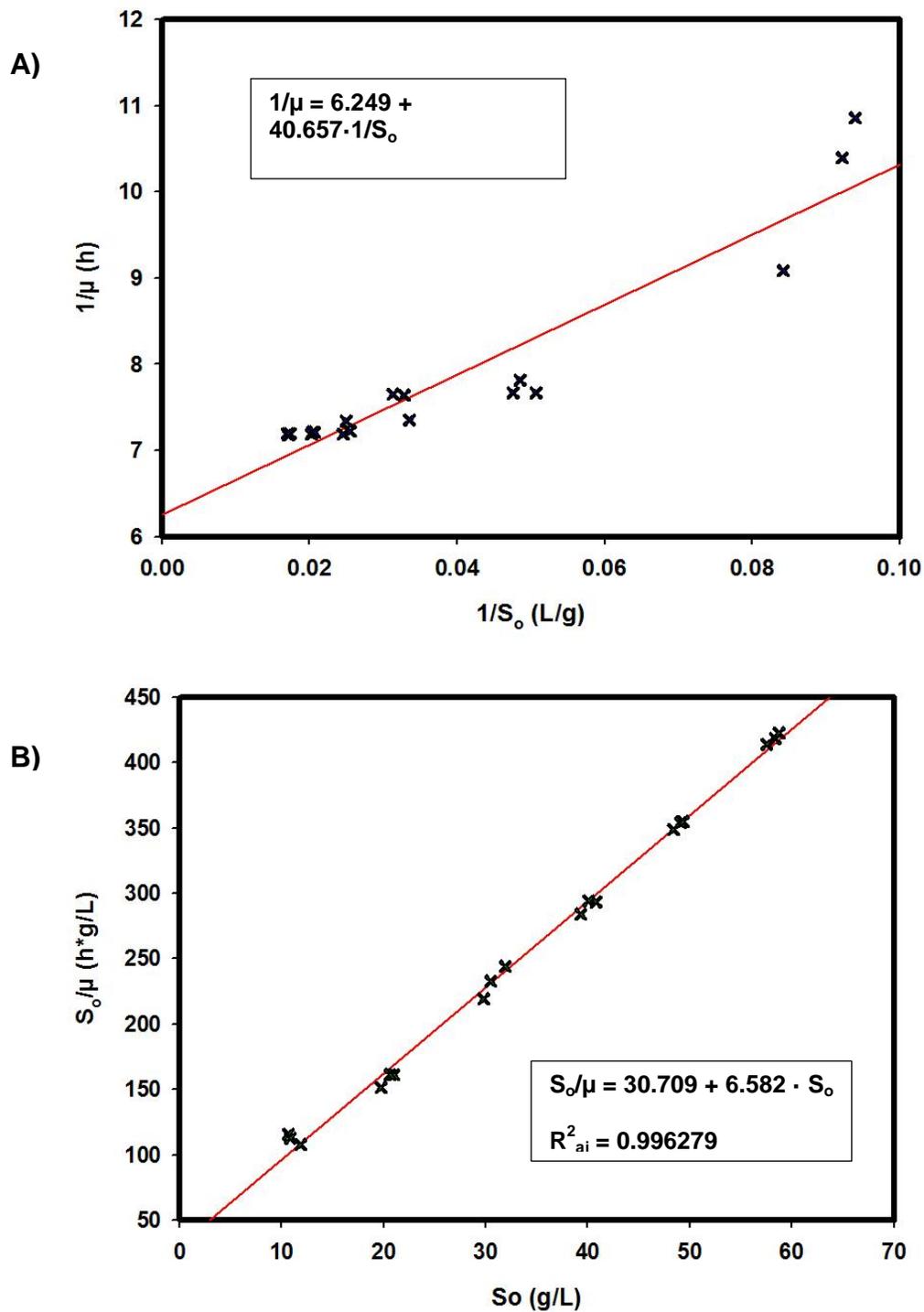


Figura 18. Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Lineweaver-Burk (A) y a la ecuación de Augustinsson (B)

Tabla 10. Parámetros cinéticos de *Lb. casei* en un medio a base de suero lácteo obtenidos por las ecuaciones de Lineweaver-Burk y Augustinsson

Ecuación	Lineweaver-Burk	Augustinsson
ks (g/L)	6.505 (0.567)	4.666 (0.570)
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0.160 (0.004)	0.152 (0.002)

(Error estándar)

El valor de Ks es la concentración de sustrato inicial a la cual μ es igual a un medio de $\mu_{\text{máx}}$. Por lo que se puede concluir que, con un sustrato inicial cercano a 4.666 g/L la velocidad específica de crecimiento de *Lb. casei* alcanzará un medio de la velocidad máxima, lo cual indica una alta afinidad del microorganismo por el sustrato. Por otro lado, al observar la Figura 17, se puede apreciar como a partir de una concentración inicial de 20 g/L de lactosa la bacteria alcanza la velocidad máxima de crecimiento (0.152 h⁻¹).

Por otro lado, al observar los parámetros estequiométricos estimados en la Tabla 9 ($Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, α y β y la concentración de biomasa máxima ($X_{\text{máx}}$)), se puede apreciar como la concentración de sustrato inicial en el medio afecta directamente los valores obtenidos. Para el caso de $Y_{P/S}$, α , β y $X_{\text{máx}}$; al incrementar la concentración inicial de lactosa en el medio, los valores de dichos parámetros aumentan; mientras que $Y_{X/S}$ disminuye. Altiok *et al.*, en 2004, reportó relaciones similares entre los parámetros y la concentración de S_0 para *Lb casei*, sin embargo los valores obtenidos de $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ y β fueron mayores a los encontrados en el presente trabajo.

Se han reportado un amplio rango de valores para los parámetros cinéticos, así como para los estequiométricos (Tabla 11), estos son dependientes de una diversidad de factores tales como: tipo de microorganismo, nutriente

limitante del crecimiento, medio de fermentación, tipo de proceso, pH del medio, temperatura del medio, suplementación, entre otros. Por lo anterior, se atribuye a diferencias en las condiciones de fermentación y la cepa empleada que los valores encontrados difieran en gran medida de los reportados anteriormente.

Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos reportados en distintos trabajos

Referencia	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	ks (g/L)	Y _{X/S}	Y _{P/S}	α	B (h ⁻¹)
^{1a} Pinelli <i>et al.</i> , 1997	1.23	0.203	0.115	0.997	---	---
^{1a} Ha <i>et al.</i> , 2003	0.994	---	0.409	0.834	1.332	0.035
^{2a} Altiok <i>et al.</i> , 2004	0.265	0.72	0.133	0.680	4.32	0.06
^{2a} Ríos 2011	0.025*	6.6	0.014	0.84	---	---
^{2b} Amrane 2005	0.48	---	0.18	0.82	2.33	0.77
^{2a} Alvarez <i>et al.</i> , 2010	0.7	---	1.582	0.638	1.8	0.193
^{23a} Presente trabajo	0.152	4.666	0.066	0.592	8.945	0.038

Estudio realizado con ¹Glucosa o ²Suero lácteo como sustrato y ^a*Lb. casei* o ^b*Lb. helveticus* como microorganismo. ³Sustrato inicial: 50 g/L

6.4.2. Modelación matemática del consumo de sustrato y de la formación de biomasa y ácido láctico

Para llevar a cabo la modelación matemática se decidió utilizar como base el modelo no 6 (Tabla 12) reportado por Altiok (2004), debido a que las condiciones de fermentación del presente trabajo se asemejan a las estudiadas

por dicho autor. Sin embargo, la ecuación de formación de biomasa del modelo no presentó un buen ajuste de los datos experimentales (Figura 19) por lo que no puede ser aplicada al sistema de fermentación en estudio. En el caso del consumo de sustrato y generación de producto, las ecuaciones propuestas por Altiok (2004) tampoco fueron adecuadas para los datos obtenidos (Figuras 19), debido a que las ecuaciones para el consumo de lactosa y producción de ácido láctico involucran a la ecuación de formación de biomasa, además que, los datos experimentales obtenidos en la presente investigación muestran un comportamiento diferente al reportado previamente por Altiok (2004). Por lo anterior, se decidió probar diferentes modelos para ajustar los datos de manera satisfactoria, obteniendo como resultado dos sistemas de ecuaciones que se adecuan en mayor grado al comportamiento observado en los datos experimentales.

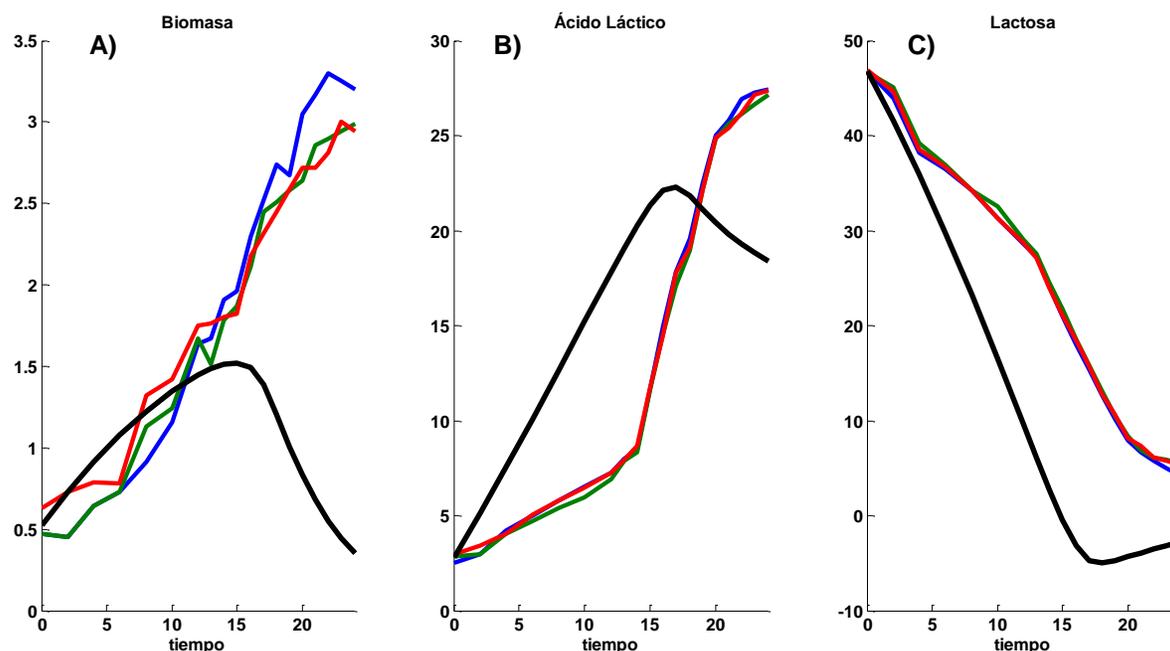


Figura 19. Estimación del modelo de Altiok (línea negra) y datos experimentales (líneas de colores) para la formación de biomasa (A), producto (B) y consumo de sustrato (C).

Tabla 12. Modelo no. 6 reportado por Altiok *et al.*, en 2004, para la formación de biomasa, ácido láctico y consumo de sustrato

$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}} \right)$	(3): Formación de biomasa
$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$	(5): Formación de producto
$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{PS}} \frac{dP}{dt} - m_s X$	(6): Consumo de sustrato

Los dos modelos propuestos se presentan en la Tabla 13. En ambos casos se decidió aplicar una ecuación del tipo logístico para representar la formación de biomasa, dado que se observó que el crecimiento microbiano es descrito por una curva sigmoidea, donde se puede observar tres fases de crecimiento: lag (0 - 6 h), exponencial (6 – 20 h) y estacionaria (20 – 24 h). De acuerdo a esta ecuación, t_c es el tiempo donde existe un punto de inflexión en dX/dt y corresponde al tiempo en el cual el incremento neto en el número de células es igual a un medio de su máximo teórico (Pelleg 2006).

En el modelo 1, se emplearon las ecuaciones propuestas por Altiok en 2004 para el ajuste de los datos experimentales de generación de producto y consumo de sustrato. Mientras que en el modelo 2, se utilizó una modificación de la ecuación de conversión del sustrato, en la cual el consumo de lactosa está en función únicamente de la producción de ácido láctico y el parámetro ρ representa el inverso de Y_{ps} .

Los parámetros estimados, mediante el programa Bio Bayes Varia, para el modelo 1 y 2 se presentan en la Tabla 14. En ambos casos se fijó el valor de $X_{\text{máx}}$ en el valor observado para estimar los parámetros, obteniendo valores muy similares entre los dos modelos, así como también con los valores calculados a partir de los datos experimentales

Tabla 13. Sistema de ecuaciones empleados para modelar los datos experimentales de formación de biomasa, generación de producto y consumo de sustrato

Ec. / Modelo	1	2
Formación de biomasa	$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot X_{m\acute{a}x} \cdot e^{\mu_{m\acute{a}x}(t_c-t)}}{(1 - e^{\mu_{m\acute{a}x}(t_c-t)})^2}$	$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot X_{m\acute{a}x} \cdot e^{\mu_{m\acute{a}x}(t_c-t)}}{(1 - e^{\mu_{m\acute{a}x}(t_c-t)})^2}$
Generación de producto	$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \left[\frac{dX}{dt} \right] + \beta \cdot X$	$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \left[\frac{dX}{dt} \right] + \beta \cdot X$
Consumo de sustrato	$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{ps}} \cdot \frac{dP}{dt} - m_s \cdot X$	$\frac{dS}{dt} = -\rho \cdot \frac{dP}{dt}$

Los valores de t_c se estimaron entre la hora 14-15, los cuales coinciden con el tiempo en que el crecimiento bacteriano se encuentra a la mitad de su desarrollo exponencial y donde la tasa de generación de ácido láctico, así como la de consumo de sustrato aumentan sustancialmente. Se puede inferir entonces, que es necesario un elevado número de bacterias ($1/2 X_{m\acute{a}x}$) para que la producción de ácido láctico se genere de forma importante, además de que éstas cuenten con el sistema enzimático adaptado adecuadamente para la hidrólisis de lactosa y su conversión a ácido láctico.

Los parámetros estimados en conjunto con los modelos 1 y 2 se usaron para simular las cinéticas de formación de biomasa y ácido láctico, así como el consumo de sustrato de una fermentación en lote de *Lb. casei* en un medio a base de suero lácteo desproteínizado y suplementado. Una comparación de los resultados obtenidos de la simulación y los datos experimentales se presenta en las Figuras 20 y 21. En general los modelos propuestos reproducen satisfactoriamente el perfil de producción de biomasa pero no el de consumo de sustrato y producción de ácido láctico, presentando un mejor ajuste de los datos experimentales con el modelo 2.

Tabla 14. Parámetros estimados para el modelo 1 y 2 para el ajuste de las cinéticas de consumo de sustrato y producción de biomasa y ácido láctico, de una fermentación tipo lote con *Lb. casei*.

Parámetro	Iniciales	Modelo 1	Modelo 2	Calculados
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0.151	0.1642	0.1702	0.152
$t_c (\text{h})$	14.493	15.301	14.917	---
$X_{\text{máx}}$	3.928	3.928	3.928	2.928
A	7.31	7.461	7.188	8.945
$\beta (\text{h}^{-1})$	0.659	0.042	0.054	0.038
$Y_{P/S}$	0.57	0.526	---	0.592
$m_s (\text{h}^{-1})$	---	0.024	---	0.065
ρ	0.5	---	1.955	---

En el caso del consumo de sustrato, se puede observar una carencia de ajuste pequeña en las primeras horas de proceso, donde se sobreestima la concentración de lactosa, en ambos modelos, después de este tiempo los modelos se ajustan a los datos experimentales, sin embargo no es posible la reproducción en la etapa final de fermentación equivalente a la fase estacionaria o de inhibición por carencia de sustrato, donde se supone una acumulación de galactosa.

Por otro lado, la ecuación propuesta por Luedeking – Piret para la producción de ácido láctico, en ambos modelos, sólo logra reproducir adecuadamente las primeras 6 horas de fermentación, sobreestimando la producción de ácido láctico en las siguientes 14 horas y subestimandola en las

últimas hora del proceso, aunque las concentración finales de ácido láctico al final de la fermentación, estimadas y obtenidas experimentalmente, son muy similares.

Es posible inferir que la mayor carencia de ajuste del modelo para la generación de ácido láctico, es debida a la carencia de ajuste en el consumo de sustrato presente entre la hora 5 y 15, ya que la hidrólisis del sustrato consumido y su conversión a ácido láctico no se realiza simultáneamente debido al complejo enzimático necesario, es decir que puede existir cierto desfase entre la hidrólisis de la lactosa y su conversión a ácido láctico. Por lo que es necesario agregar un factor de corrección, el cual involucre dicho desfase, además de ser capaces de medir con mayor precisión la conversión de lactosa a ácido láctico para minimizar las carencias de ajuste observadas.

Por otro lado, la falta de ajuste al final del proceso, también puede ser minimizada al introducir en el modelo parámetros de inhibición por limitaciones en el sustrato y por la acumulación de la galactosa, para ello es necesario un estudio más detallado de los efectos inhibitorios de éstos, así como la cuantificación del perfil de hidrólisis de la lactosa a galactosa y glucosa en el medio.

Diversos autores han propuesto modelos matemáticos para representar la producción de ácido láctico, sin embargo el perfil experimental encontrado en el presente estudio con respecto a la producción de ácido láctico es tan singular que no fue posible su aplicación en este estudio. En ese aspecto, Ríos en 2011 propuso la aplicación de regresión por polinomios obteniendo un ajuste adecuado de los datos, el uso de este tipo de modelamiento puede ser factible en la presente investigación ya que la cepa del microorganismo empleado es la misma, reduciendo de esta manera el ruido en el modelamiento, además que los perfiles presentados por dicho autor son muy similares a los nuestros.

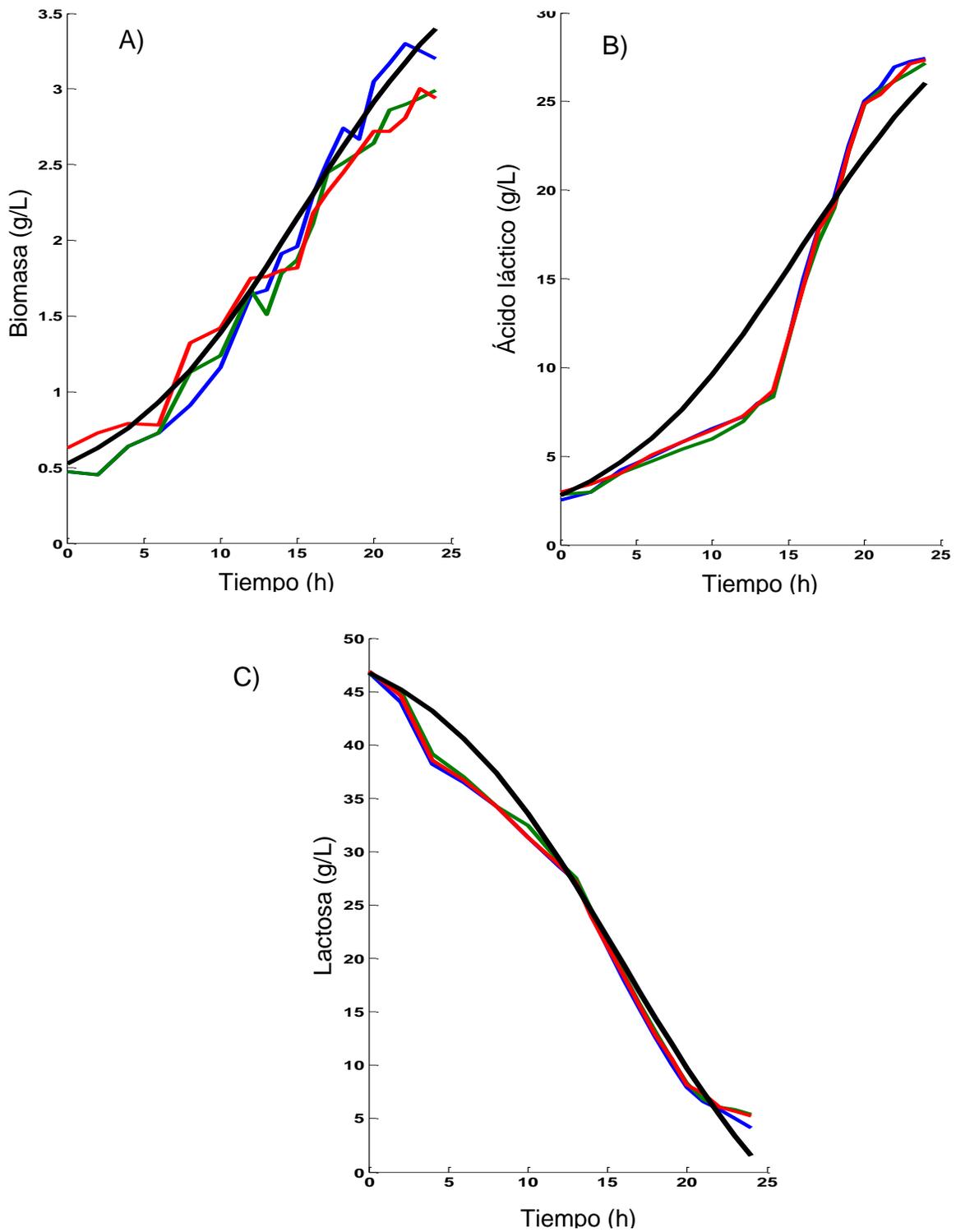


Figura 20. Estimación del modelo 1 (línea negra) y datos experimentales (líneas de colores) para la formación de biomasa (A), producto (B) y consumo de sustrato (C).

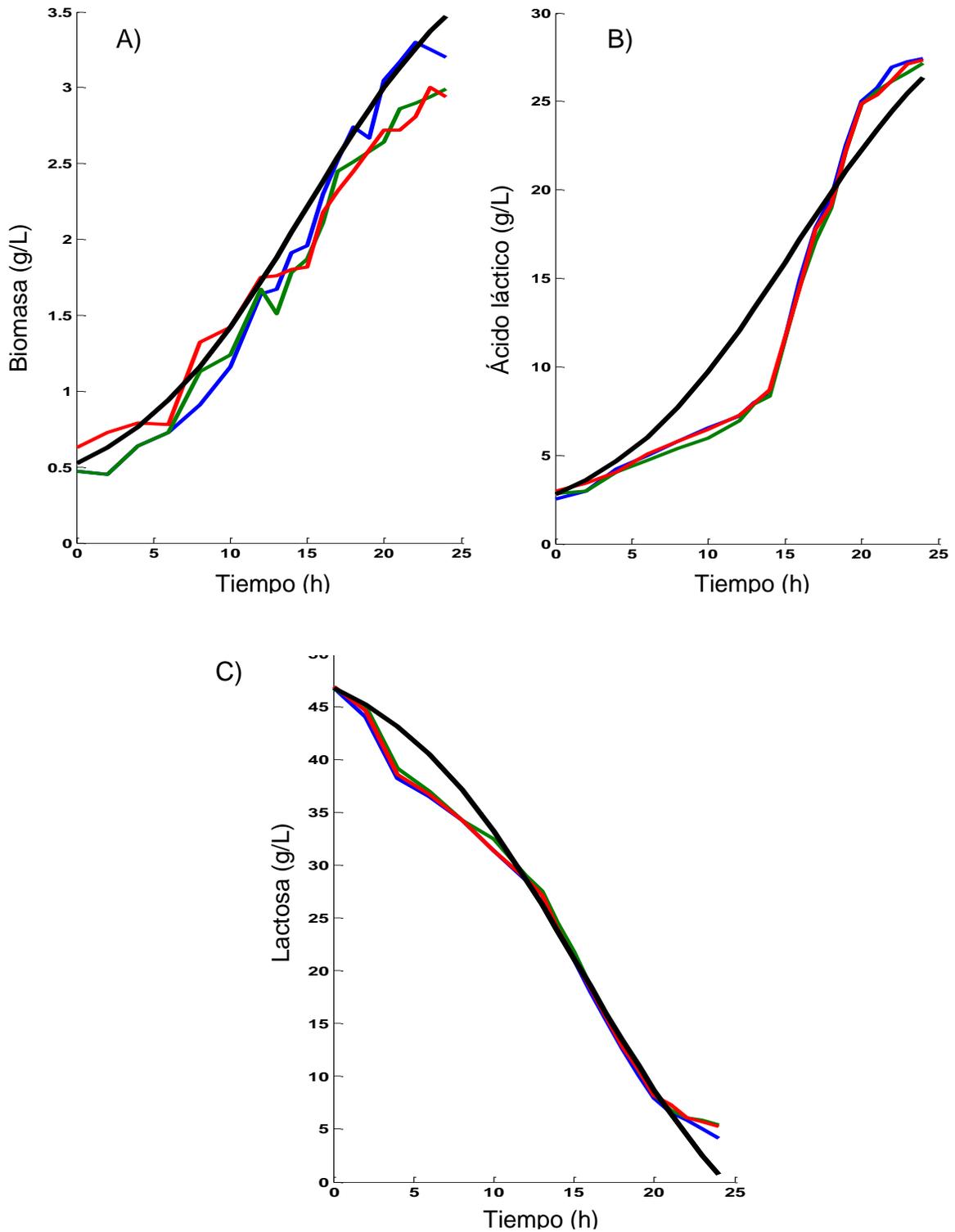


Figura 21. Estimación del modelo 2 (línea negra) y datos experimentales (líneas de colores) para la formación de biomasa (A), producto (B) y consumo de sustrato (C).

6.5. Evaluación del efecto de las condiciones de operación del sistema de unidad de membrana para la separación del ácido láctico del caldo de fermentación por nanofiltración

Para la evaluación del funcionamiento de las membranas de nanofiltración en la separación de ácido láctico, se probaron dos membranas denominadas TFC-SR2 y TFC-SR3, así como diversas condiciones de operación del sistema, como el pH de la solución de alimentación, presión en el flujo de retenido y el tiempo de separación. Para lo cual se tomaron como variables respuesta el flujo de permeado, la retención de lactosa y la recuperación de ácido láctico.

6.5.1. Evaluación de las condiciones de operación del sistema sobre el flujo de permeado

Se evaluó el flujo de permeado (J_P) a diferentes tiempos de la separación de ácido láctico para determinar el posible ensuciamiento de las membranas, así como la influencia de las condiciones de operación del sistema. Los resultados del flujo de permeado se presentan en la Figura 22.

Los resultados señalan un mayor flujo de permeado al emplear la membrana TFC-SR3, esto puede ser debido a que, la porosidad y el tamaño de corte de peso molecular son mayores en esta membrana que en la TFC-SR2. Por otro lado, al emplear cualquiera de las membranas, el flujo de permeado es mayor al trabajar a una presión de 300 psig y este disminuye a mayores tiempos de filtrado. Obteniendo valores de flujo de permeado entre 100 y 20 L/hm².

El análisis estadístico, mostró que los factores de estudio pH, presión y tiempo, así como las interacciones entre pH – presión y membrana - tiempo son significativos en el flujo de permeado.

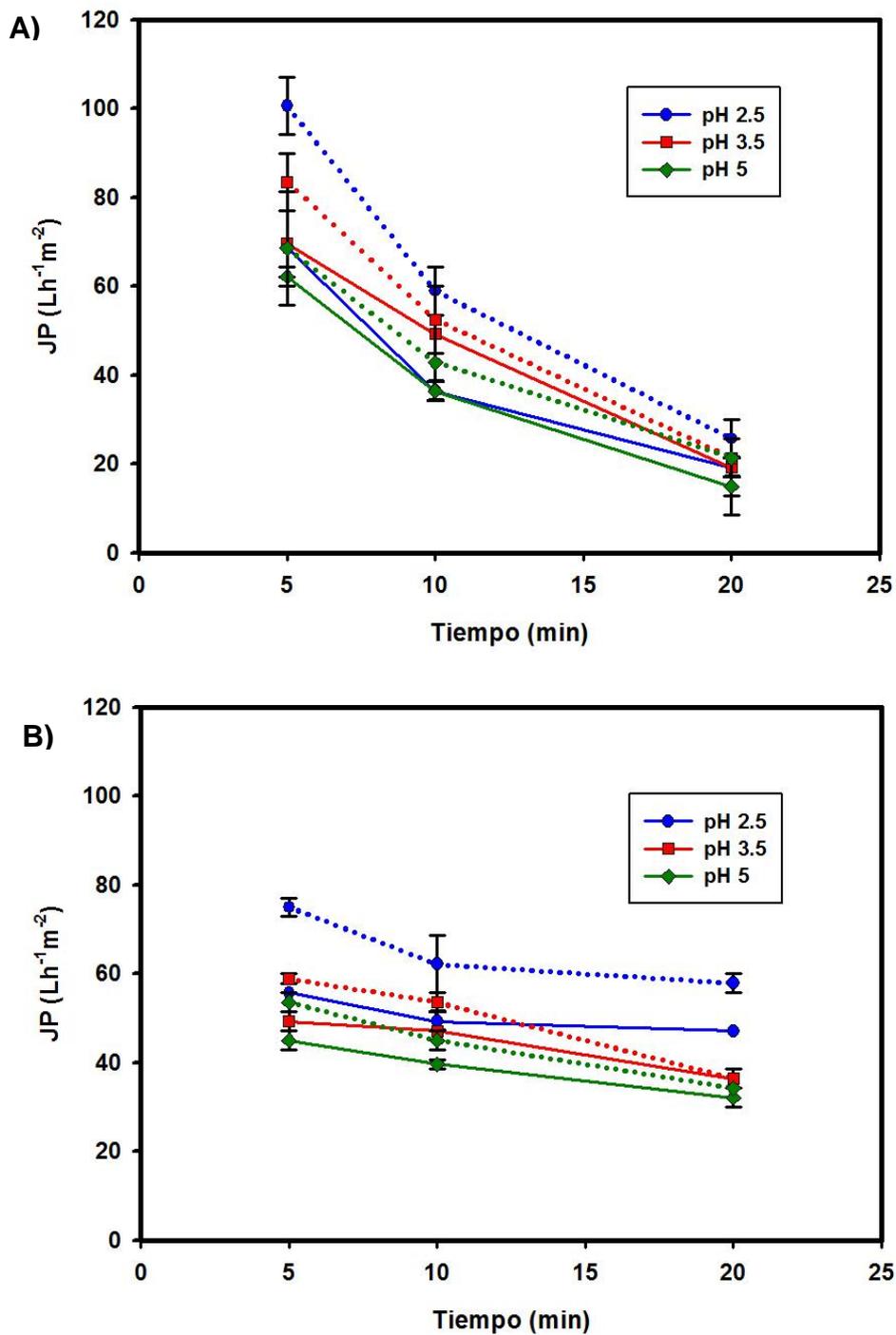


Figura 22. Flujo de permeado obtenido bajo diferentes pH de alimentación (2.5, 3.5 y 5), a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para las membranas TFC-SR3 (A) y TFC-SR2 (B) a una presión de 150 (línea continua) y 300 psig (línea punteada) en el flujo de retención.

La interacción entre el tipo de membrana empleado y el tiempo indica que, tal como se había mencionado, el flujo de permeado disminuye con el paso del tiempo, lo cual supone un ensuciamiento en la membrana; sin embargo este efecto no es tan marcado para la membrana TFC-SR2 manteniendo flujos permeado similares a través del tiempo. Dicho efecto puede deberse a que la superficie de la membrana TFC-SR3 favorece las interacciones por adsorción y concentración por polarización entre los solutos y la superficie de la membrana, disminuyendo como consecuencia el flujo de permeado. Bellona *et al.* (2004) reportaron que los compuestos polares pueden ser retenidos en la superficie de la membrana mediante puentes de hidrógeno, además que estos compuestos, al presentar un tamaño similar al diámetro de poro de la membrana, causan una disminución mayor en el flujo de permeado debido a que bloquean los poros.

Por otro lado la interacción ente pH – presión muestra que, el flujo de permeado disminuye al aumentar el pH de la solución de alimentación, sin embargo este efecto es mayor al trabajar a una presión de 300 psig. Esto puede ser debido a que en la superficie de las membranas se están llevando a cabo una serie de interacciones fisicoquímicas que influyen en la retención de solutos y por ende en el flujo de permeado, dichas interacciones tienen lugar a pH cercanos o mayores al punto isoeléctrico de la membrana (ej., pH 5). González *et al.*, en 2008, quienes trabajaron en la separación por nanofiltración del ácido láctico a partir de soluciones modelo, reportan resultados similares a los encontrados en este investigación, obteniendo una disminución en el flujo de permeado de 75 a 40 L/hm² al aumentar el pH de 2.7 a 6.

En general el flujo de permeado se ve influenciado por todos los factores en estudio, encontrando valores mayores al inicio de la filtración y a una presión de 300 psig (ej., JP= 73.392 L/hm² a 300 psig / 5 min). Por otra parte con la membrana TFC-SR3 se obtiene una reducción mayor en el flujo de permeado a través del tiempo de 73.392 a 32.857 L/hm², mientras que con TFC-SR2 sólo disminuye de 58.393 a 28.214 L/hm², una menor reducción en el flujo de

permeado indica un menor ensuciamiento y por ende una mayor vida útil de la membrana, de tal manera que, el uso de la membrana TFC-SR2 se presume mejor bajo estas condiciones. Sin embargo es necesario corroborar estos resultados con los obtenidos para la retención de lactosa y recuperación de ácido láctico.

6.5.2. Evaluación de las condiciones de operación del sistema sobre la retención de lactosa y la recuperación de ácido láctico.

Se evaluó el porcentaje de retención de lactosa ($\%R_L$) y de recuperación de ácido láctico ($\%Rec_{AL}$) a diferentes tiempos, como una medida de la eficiencia de separación de la membrana bajo diferentes condiciones de operación del sistema.

Con respecto a los resultados obtenidos de la retención de lactosa (Figura 23 y 24), el análisis estadístico mostró, que los efectos de estudio significativos son: pH, presión, membrana y tiempo, así como también las interacciones entre pH – membrana y membrana - tiempo. Los mayores valores de retención de lactosa se logran con el uso de la membrana TFC-SR2 alrededor del 95% y éstos no son afectados por las condiciones de operación. Mientras que para TFC-SR3 la retención de lactosa es menor (80%) y disminuye con el paso del tiempo. Esto puede ser debido a que, la lactosa es adsorbida por la membrana y logra pasar a través de ella. Braeken *et al.*, (2005), reportaron que es posible el paso a través de la membrana de ciertos compuestos orgánicos con un peso molecular mayor al MWCO por medio de la adsorción de los mismos. Por otro lado, la retención de lactosa al emplear la membrana TFC-SR3 aumenta conforme aumenta el pH, sin embargo este efecto no es significativo para la membrana TFC-SR2. Lo anterior se puede deber a que en la superficie de la membrana TFC-SR3 se están llevando a cabo una mayor cantidad de interacciones fisicoquímicas, las cuales se favorecen a pH 5, dando como resultado una disminución en el tamaño de poro y como consecuencia una mayor retención de compuestos.

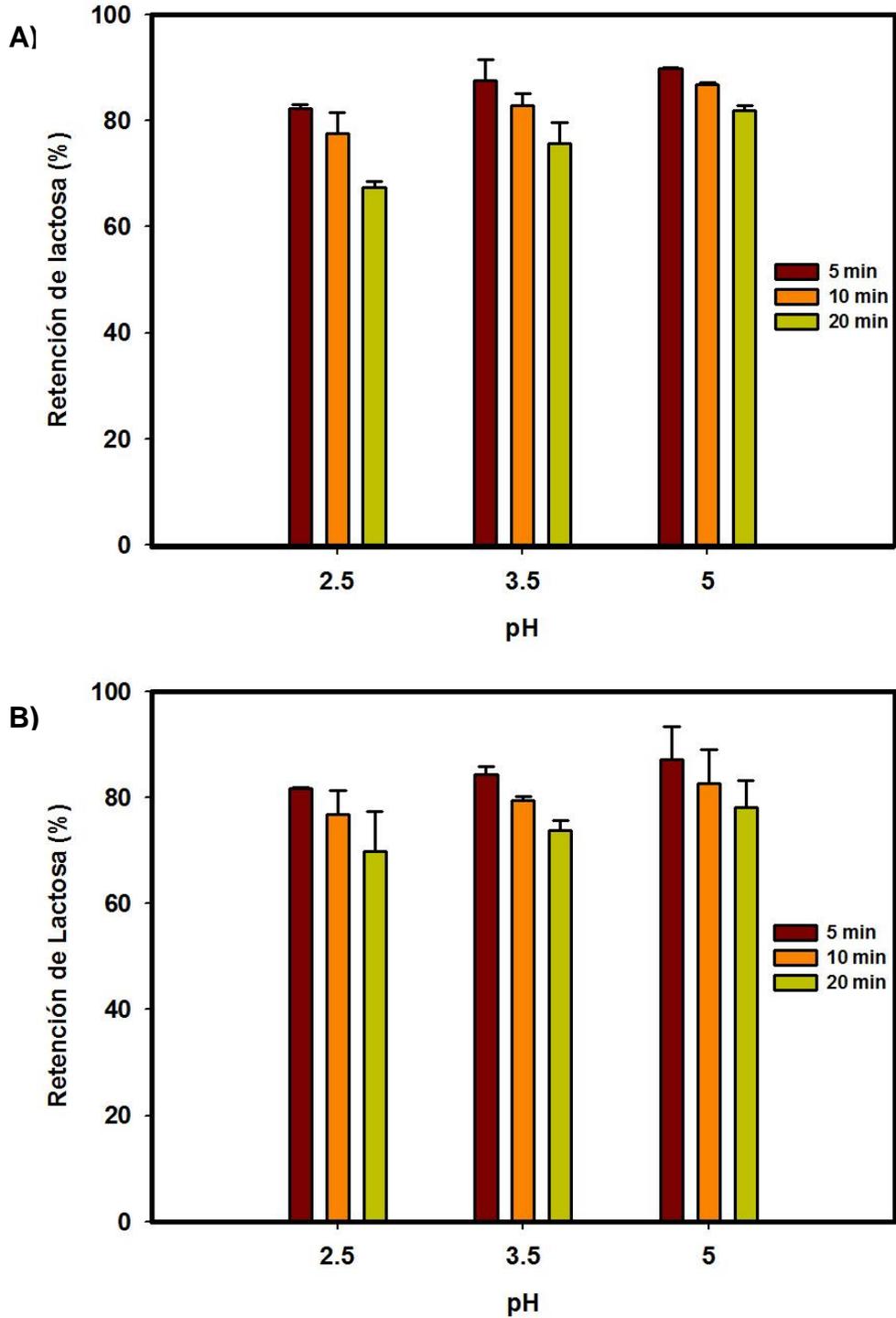


Figura 23. Retención de lactosa obtenida bajo diferentes pH de alimentación (2.5, 3.5 y 5), a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para la membrana TFC-SR3 a una presión de 150 (A) y 300 psig (B) en el flujo de retención

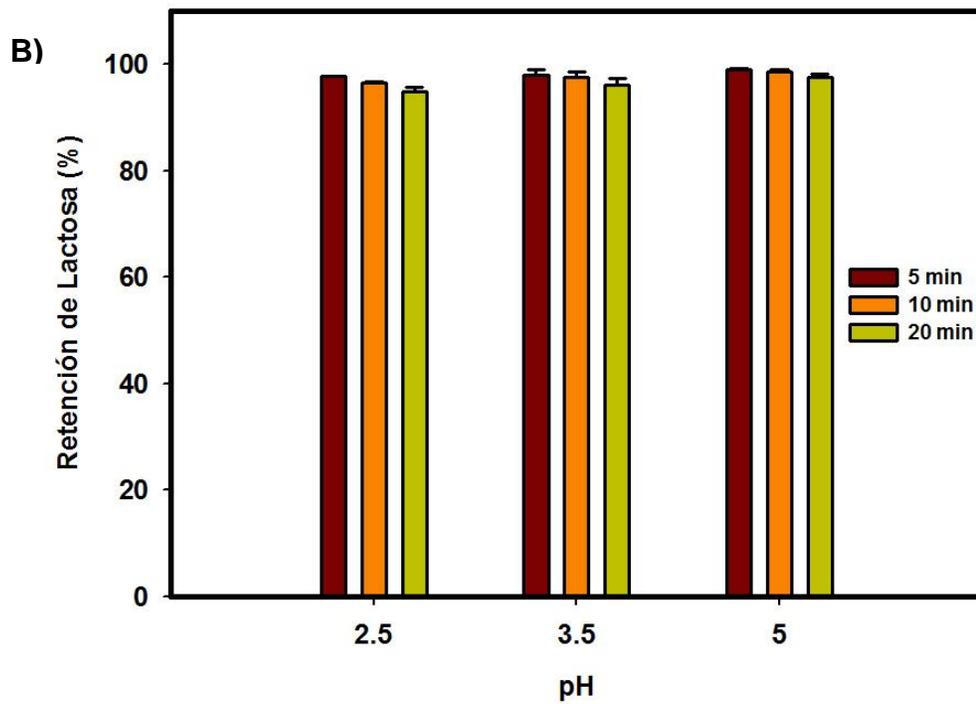
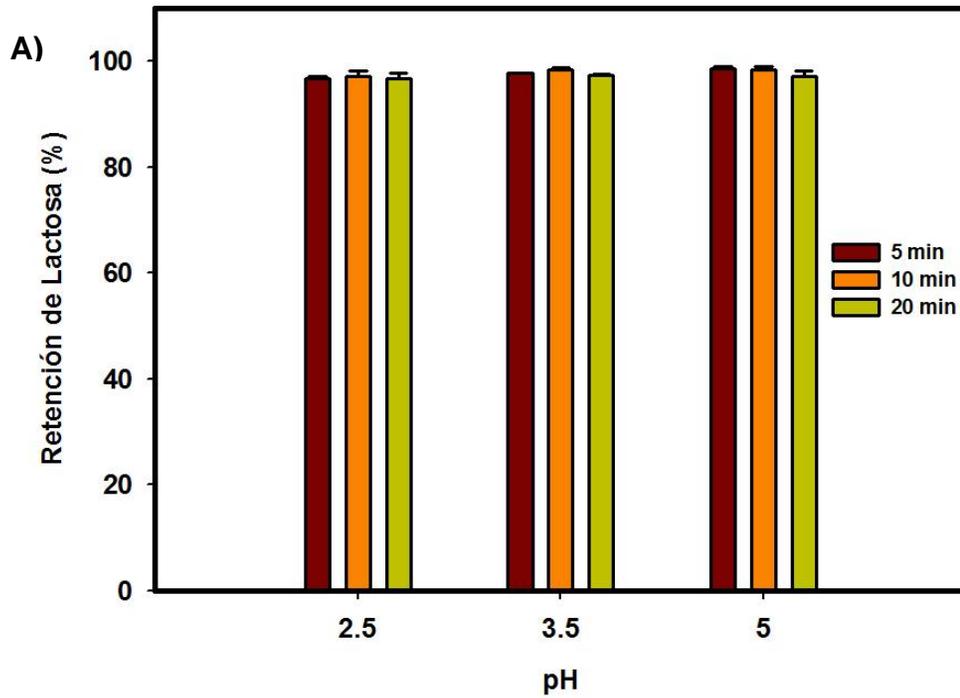


Figura 24. Retención de lactosa obtenida bajo diferentes pH de alimentación (2.5, 3.5 y 5), a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para la membrana TFC-SR2 a una presión de 150 (A) y 300 psig (B) en el flujo de retención.

De acuerdo a los resultados obtenidos con respecto a la recuperación de ácido láctico (Figura 25), se puede observar una mayor recuperación al emplear la membrana TFC-SR2 a un tiempo de filtrado de 20 min. Según el análisis estadístico, los cuatro factores estudiados así como también las interacciones pH – presión, pH – tiempo y membrana – tiempo afectan significativamente la recuperación de ácido láctico en el permeado.

La Figura 25 muestra que, la recuperación de ácido láctico es mayormente afectada por el pH, observando una mayor recuperación a un pH de 2.5, seguida de 3.5 y 5. Esto es debido a un efecto por carga, al aumentar el pH se incrementa la densidad de cargas negativas en la superficie de la membrana, lo cual ocasiona una mayor repulsión electrostática entre los solutos cargados negativamente y la membrana. Ahora bien, considerando que el ácido láctico tiene un pKa de 3.86 a 25°C (González *et al.*, 2008), al aumentar el pH se incrementa la concentración de ácido láctico en su forma disociada (cargado negativamente), ocasionando su retención. Mientras que a pH debajo de 2.7 solamente el 6.47% de ácido láctico se encuentra en forma de lactato por lo que el efecto de carga es considerado despreciable y la recuperación es mayor.

Por otra parte, se puede observar que se tiene una mayor recuperación de la cantidad de ácido láctico a los 20 minutos de filtrado y a presión de 300 psig, sin embargo la concentración de ácido láctico en el permeado es muy similar a los 5, 10 y 20 min del proceso. Por lo que a un mayor flujo de permeado se tendrá una recuperación de ácido láctico mayor en un menor tiempo. De este modo al emplear la membrana TFC-SR2, a un pH de 2.5 – 3.5, se obtienen mayores cantidades de ácido láctico recuperado dado que, aunque presenta menores flujos de permeado al inicio del proceso, el JP permanece constante, además que las interacciones entre la membrana y los solutos no afectan la recuperación de ácido láctico. Mientras que, para recuperar cantidades similares de ácido láctico con la membrana TFC-SR3 bajo estas mismas condiciones, necesitaría un periodo de

recirculación más largo, sin embargo esto no es factible dado el grado de ensuciamiento tal alto que presenta.

Varios autores han estudiado la separación de ácido láctico a partir de soluciones modelo y de caldo de fermentación. González *et al.*, en 2008, investigaron la separación de ácido láctico de soluciones modelo usando membranas compuestas de poliamida similares a la TFC-SR3 y reportaron valores similares a los encontrados en la presente investigación de recuperación de ácido láctico (85 y 55% a pH de 2.5 y 5) a una presión de 200 psig. Por su parte Sikder *et al.*, en 2012, reportaron valores elevados de recuperación de ácido láctico (89 %) y de retención de lactosa (95%) los cuales coinciden con los resultados encontrados, ellos trabajaron con la separación de ácido láctico a partir de caldo de fermentación empleando membranas de nanofiltración con características similares a TFC-SR2 a 200 psig.

En general el uso de la membrana TFC-SR2, mostró los mejores resultados en la separación de ácido láctico (Tabla 15) al trabajar con una presión de 300 psig a pH entre 2.5 y 3.5 (pH por debajo del pKa del ácido láctico), obteniendo una concentración de ácido láctico en el permeado de alrededor de 80 g/L. Además con el uso de esta membrana se retiene aproximadamente el 98 % de la lactosa, logrando una concentración de 0.15 g/L a los 20 minutos de nanofiltración. Mientras que con la membrana TFC-SR3 al trabajar a un pH de 2.5 y 300 psig, se obtiene un máximo de ácido láctico en el permeado de 54 g/L y de 1.5 g/L de lactosa. Lo cual muestra que, el material de la membrana juega un papel de suma importancia en la purificación del ácido láctico, además que es necesario tomar en cuenta la naturaleza de los solutos para inferir las mejores condiciones de trabajo, ya que la separación de estos compuestos no sólo depende de las propiedades físicas, sino también de las propiedades químicas.

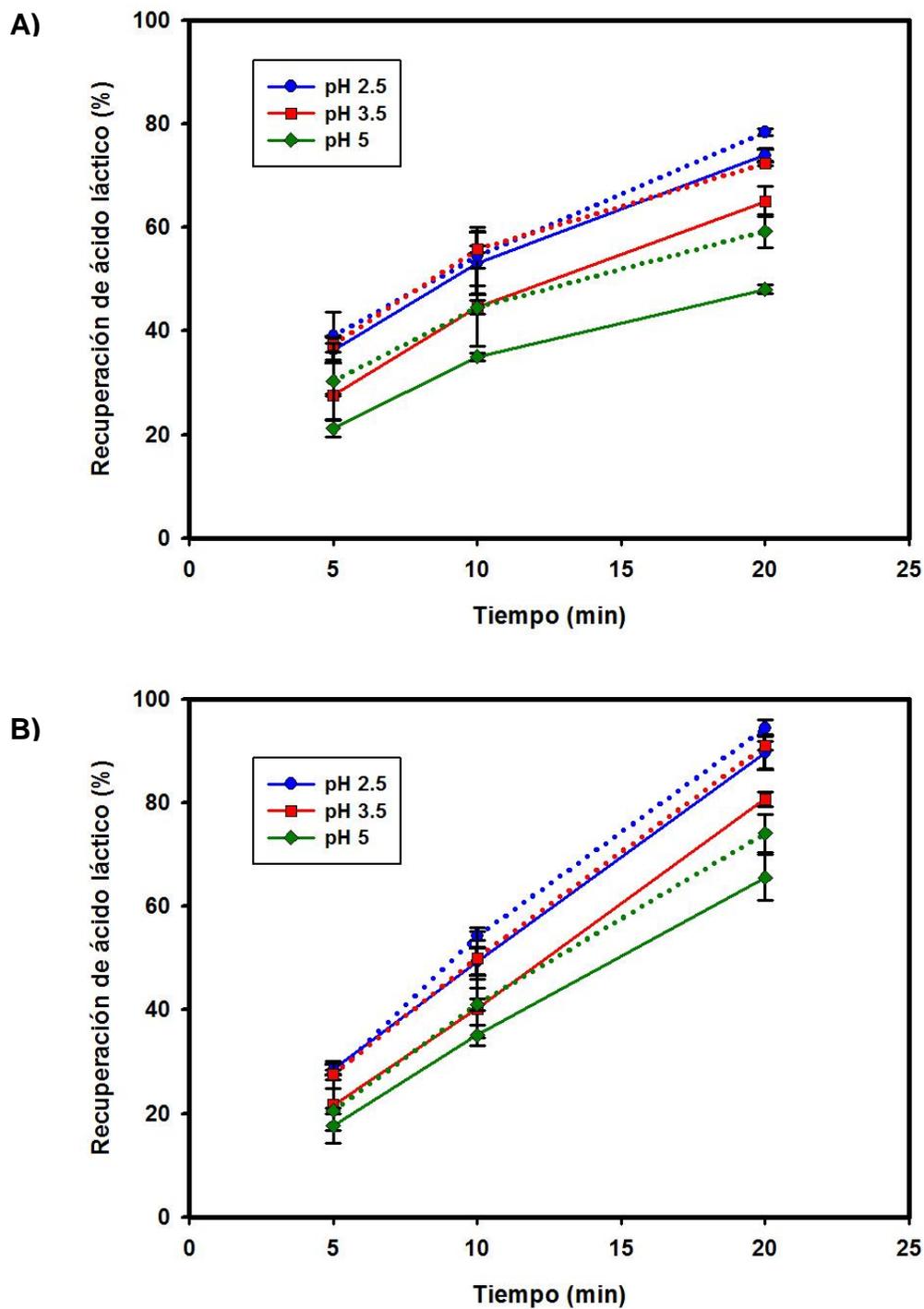


Figura 25. Recuperación de ácido láctico en el flujo de permeado bajo diferentes pH de alimentación (2.5, 3.5 y 5), a los 5, 10 y 15 minutos del filtrado para las membranas TFC-SR3 (A) y TFC-SR2 (B), a una presión de 150 (línea continua) y 300 psig (línea puntada).

Tabla 15. Valores de la disminución en el flujo de permeado ($-\Delta J_P$), retención de lactosa, recuperación y concentración de ácido láctico a los 20 min de proceso.

	pH	Presión (psig)	$-\Delta J_P$	%R _L	%Rec _{AL}	[Ác. Láctico] (g/L)
TFC-SFR3	2.5	150	49.286 (3.030)	67.402 (1.045)	73.944 (1.203)	54.013 (1.575)
	2.5	300	75.000 (15.152)	69.910 (7.395)	78.423 (0.739)	53.950 (0.561)
	3.5	150	50.357 (4.546)	75.629 (4.012)	65.017 (2.968)	51.358 (7.410)
	3.5	300	62.143 (3.030)	73.729 (1.895)	75.359 (0.474)	50.254 (0.626)
	5	150	47.143 (6.061)	81.952 (0.966)	48.030 (0.840)	45.335 (2.284)
	5	300	47.143 (24.244)	78.108 (5.053)	59.293 (3.160)	43.839 (8.398)
TFC-SFR2	2.5	150	8.571 (0.001)	96.777 (0.928)	89.726 (3.358)	89.628 (7.705)
	2.5	300	17.143 (0.001)	94.787 (0.856)	94.439 (1.575)	87.787 (4.327)
	3.5	150	12.857 (0.001)	97.320 (0.190)	80.674 (1.477)	84.626 (0.007)
	3.5	300	22.500 (4.546)	96.118 (1.294)	90.986 (0.833)	79.459 (3.361)
	5	150	12.857 (6.061)	97.040 (1.163)	65.535 (4.423)	70.760 (5.676)
	5	300	19.286 (3.030)	97.570 (0.598)	74.111 (3.697)	71.582 (3.839)

7. CONCLUSIONES

El suero lácteo suplementado mostró ser un sustrato adecuado y de gran disponibilidad para la producción de ácido láctico, constituyendo así, una alternativa para su aprovechamiento y disminución de la contaminación que produce al ser drenado.

La suplementación del medio de cultivo con sulfato de manganeso a una concentración de 0.03 g/L tiene un efecto benéfico significativo en la fermentación de suero desproteinizado por *Lb. casei*, observando una alta productividad (2.9 g/Lh) y conversión de lactosa (85.5%). Mientras que la adición de diferentes concentraciones de $MgSO_4$ no mostró diferencias significativas.

La producción de ácido láctico en una fermentación tipo lote con *Lb. casei* tiene tres etapas características: 1) fase lag extendida, durante la cual el microorganismo adapta adecuadamente el sistema enzimático para la hidrólisis de la lactosa y su conversión a ácido láctico; 2) fase de alta producción de ácido láctico y consumo de sustrato, la cual coincide con el medio del crecimiento exponencial de la bacteria y 3) fase de inhibición por carencia de sustrato, donde cesa el crecimiento bacteriano y producción de ácido láctico.

Los parámetros cinéticos y estequiométricos en un proceso de fermentación son dependientes de los factores que intervienen en la fermentación, tales como: tipo de sustrato, [sustrato inicial], [inóculo], tipo de microorganismo, entre otros.

El modelo matemático propuesto por Altiok en 2004 no fue adecuado para modelar la formación de biomasa, el consumo de sustrato y la formación de producto de los datos de la presente investigación. La aplicación de dos nuevos modelos en base a la ecuación logística mostró tener un ajuste adecuado de los datos con respecto a los perfiles de biomasa y consumo de sustrato, sin embargo no fue posible el modelamiento de los perfiles de producción de ácido láctico. Por

lo que es necesario seguir ajustando el modelo y valorar posibles factores que estén afectando el sistema.

El valor de t_c (15 h), donde la formación de biomasa es igual al medio de su máximo teórico, es equivalente al tiempo en el cual la tasa de formación de ácido láctico y consumo de sustrato aumenta drásticamente.

Para llevar a cabo la separación de ácido láctico es factible el uso de la tecnología de membranas de nanofiltración, sin embargo es necesario considerar ciertas características como son: material de la membrana, afinidad de la membrana por el compuesto a separar, naturaleza de los solutos, pH de la solución, entre otros; para así obtener una mejor separación y/o purificación del compuesto de interés.

La membrana TFC-SR2 mostró los mejores resultados en la separación de ácido láctico a una presión de 300 psig a pH debajo del pKa del ácido láctico, recuperando 95% del ácido láctico y reteniendo el 98% de la lactosa a los 20 minutos de nanofiltración.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agenson K.O., Oh J.I. y Urase T. 2003. Retention of a wide variety of organic pollutants by different nanofiltration/reverse osmosis membranes: controlling parameters of process. *Journal of Membrane Science*. 225: 91–103.
- Aider, M., Halleux D. y Melnikova I. 2009. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 334-341.
- Almécija, M.C. 2007. Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España.
- Alonso S., Herrero M., Rendueles M. y Díaz M. 2010. Residual yoghurt whey for lactic acid production. *Biomass and bioenergy*. 34: 931 – 938.
- Altioğ D., Tokatlı F. y Harsa Ş. 2006. Kinetic modelling of lactic acid Production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology Biotechnology*. 81:1190–1197.
- Altioğ D. 2004. Kinetic modelling of lactic acid production from whey. A dissertation submitted to the graduate school in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Izmir Institute of Technology Izmir, Turkey.
- Alvarez M. M., Aguirre-Ezkauriatza E. J., Ramírez-Medrano A., y Rodríguez-Sánchez Á. 2010. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *Journal Dairy Science*. 93:5552–5560.
- Amrane A. 2005. Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*. 80: 345-352.
- Amrane A. 2001. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 827-834.
- Amrane A. y Prigent Y. 1994. Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment. *Applied Microbiology Biotechnology*. 40:644-649.

- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Capítulo 1 en Lactic Acid Bacterial: Microbiological and Functional Aspects. Salminen, S., Wright A. Y Oumehand. Ed. Marcel – Dekker, Nueva York.
- Bailey J. E., Ollis D. F. 1986. Biochemical engineering fundamentals. Ed. McGraw-Hill, Inc., USA: p.385.
- Bellona C., Drewes J. E., Xu P. y, Amy G. 2004. Factors affecting the rejection of organic solutes during NF/RO treatment— A literature review. Water Research. 38: 2795–2809.
- Bellona C. y Drewes J. E. 2005. The role of membrane surface charge and solute physico-chemical properties in the rejection of organic acids by NF membranes. Journal of Membrane Science 249: 227–234.
- Benitez F. J., Acero J. L., Real F. J., Roldán G. y Rodríguez E. 2011. Ultrafiltration and nanofiltration membranes applied to the removal of the pharmaceuticals amoxicillin, naproxen, metoprolol and phenacetin from water. Society of Chemical Industry. In press.
- Berk, Z. 2009. Food process engineering and technology. Ed. Academyc Press. London UK. Capítulo 10: 233-253.
- Bouchoux A., Roux-de Balmana H. y Lutin F. 2006. Investigation of nanofiltration as a purification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electrodialysis operations. Separation and Purification Technology 52: 266–273.
- Boussu K., Baerdemaeker J., Dauwe C., Weber M., Lynn K.G., Depla D., Aldea S., Vankelecom I.F.J., Vandecasteele C., y Van der Bruggen B. 2007. Physico-chemical characterization of nanofiltration membranes. ChemPhysChem. 8: 370-379.
- Braeken L., Ramaekers R., Zhang Y., Maes G., Van der Bruggen B., Vandecasteele C. 2005. Influence of hydrophobicity on retention in nanofiltration of aqueous solutions containing organic compounds. Journal of Membrane Science 252: 195–203.
- Burgos-Rubio. C.N., Okos M.R. y Wankat P.C. 2010, Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. Biothechnology Prog. 16: 305-314.
- Büyükileci A.O. y Harsa S. 2004. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). Journal of Chemical Technology Biotechnology 79: 1036–1040.

- Carrillo G. E., Roberts P. D., Becerra V. M. 2001. "Genetic algorithms for optimal control of beer fermentation," IEEE International Symposium on Intelligent Control, Mexico City, Mexico, p. 391-396.
- Chen, J.P., Mou, H., Wang, L.K. y Matsuura, T. 2009. Membrane filtration. Capítulo 7 en Handbook of Environmental Engineering, Volumen 4: Advanced Physicochemical Treatment Processes. Wang L.K., Hung Y.S. y Shamas N.S. The Human Press, Totowa, NJ.
- Cuartas-Uribe, B. E. 2005. Estudio del proceso de nanofiltración para la desmineralización de lactosuero dulce. Tesis de doctorado en ciencias del departamento de ingeniería química y nuclear de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Cui, F., Wan C., Li Y., Liu Z. y Rajashekar G. 2012. Co-production of lactic acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements. Food Bioprocess Technology. 5: 1278–1286.
- 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.
- Fajardo, P.B., Rodríguez, I.A., Pastrana, L.C. y Pérez, N.G. 2008. Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei* supsp. *casei* CECT 4043 in whey. International Dairy Journal. 18: 1057-1065.
- Fernandes, M., Fornari R., Mazutti M., Oliveira D., Ferreira F., Cichoski A., Cansian R., Luccio M. y Treichel H. 2009. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. Journal of Food Engineering 90: 119–123.
- Fitzpatrick J. J., Ahrens M. y Smith S. 2010. 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.
- Ghaly A.E., Tango M.S.A., Mahmoud N.S. y Avery A.C. 2004. Batch propagation of *Lactobacillus helveticus* for production of lactic acid from lactose concentrated

- cheese whey with microaeration and nutrient supplementation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 65–75.
- González M. I., Alvarez S., Riera F. A. y Álvarez R. 2007. Economic evaluation of an integrated process from lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*. 80: 553-561.
- González M. I., Alvarez S., Riera F. A. y Álvarez R. 2008. Lactic acid recovery from whey ultrafiltrate fermentation broths and artificial solutions by nanofiltration. *Desalination* 228: 84–96.
- González S.M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57: 1-11.
- 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.
- Higson A. 2011. Lactic acid production. *Renewable Chemicals Factsheet*. Platform Chemicals. NNFCC.
- Hofvendahl K. y Hanh H.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.
- Jelen, P. 2003. Whey processing. Utilization and Products. En: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK. 2739-2745.
- John R. P., Nampoothiri K. M. 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.
- Kashket E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *Federation of European Microbiology Societies Reviews* 46: 233-244.
- Lee, E. K. y Koros, W. J. 2004. Membranes, synthetic, applications. *Encyclopedia of Physical Science*. Third Edition, Volume 9. Ed. Academic Press. 279-344.

- Li Y. y Shahbazi A. 2006. Lactic Acid Recovery From Cheese Whey Fermentation Broth Using Combined Ultrafiltration and Nanofiltration Membranes. *Applied Biochemistry and Biothecnology*. 129-132: 985-996.
- Li Y., Shahbazi A., Coulibaly S. y Mims M.M.. 2007. Semicontinuous production of lactic acid from cheese whey using integrated membrane reactor. *Applied Biochemistry and Biothecnology*. 136-140: 897-907.
- Li Y., Shahbazi A., Williams K. y Wan C. 2008. Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 147:1–9.
- Liu X, Chung K., Yang S. y Yousef A. 2005. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry*. 40: 13-24.
- 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.
- Limsowtin G.K.Y., Broome M.C. y Powell I.B. 2002. Lactic acid bacteria, taxonomy. Elsevier Science Ltd. P 1470-1478.
- Litchfield, J. H. 2009. Lactic acid, microbially produced. *Encyclopedia of Microbiology*. 362-372.
- Londoño. M., Sepúlveda J., Hernández A. y Parra J. 2008. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 61: 4409-4421.
- Londoño, M. 2006. Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en nutrición humana. Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia* 16: 11-20.
- Madigan, M. T., Martinko J. M. y Parker, J. 2004. Brock: Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. 10ª Edición. 103-111.
- Mänttari M., Pihlajamäki A. y Nyström M. 2006. Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH. *Journal of Membrane Science*. 280: 311–320.
- 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, Nueva York.
- McNeil B., Harvey L. M. 1990. Fermentation-a practical approach. Oxford University Press, England.
- Mohammad A.W., Kadir Basha R. y Leo C.P. 2010. Nanofiltration of glucose solution containing salts: Effects of membrane characteristics, organic component and salts on retention. *Journal of Food Engineering* 97: 510–518.
- Muñi, A., Paez G., Faría J., Ferrer J. y Ramones E. 2005. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15: 361–367.
- 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 a single end mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. *World Journal Microbial Biotechnology*. 25: 1423-1429.
- Narayanan, N., Roychoudhry, P. K. y Aradhana, S. A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *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, Nueva York.
- Pal P., Sikder J., Roy S. y Giorno L. 2009. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing* 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.
- Parra H.A.R. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*. 62: 4967-4982.
- Pelleg, M. 2006, *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems, Models for Predicting Growth and Inactivation*. CRC. Boca Ratón. Capítulo 8.
- Ríos C.A. 2011. Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando tecnología de

membranas. Tesis de maestría en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro.

- 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 L.C. y Rodríguez de S. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(1):54-65.
- Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP). 2012. Boletín de Leche, pp. 14.
- Shepers, A.W., Thibault, J. y Lacroix, C. 2012. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 176-186.
- Sikder J., Roy M., Dey P y Pal P. 2012. Techno-economic analysis of a membrane-integrated bioreactor system for production of lactic acid from sugarcane juice. *Biochemical Engineering Journal*. 63: 81-87.
- Sinclair C. G., Kristiansen B. 1987. "Mathematical models," *In Fermentation kinetics and modelling*, edited by J. D. Bu'Lock. Open University Press, USA.
- Teixeira M.R., Rosa M.J. y Nyström M. 2005. The role of membrane charge on nanofiltration performance. *Journal of Membrane Science*. 265:1 60–166.
- Urribarrí L., Vielma A., Páez G., Ferrer J., Mármol Z. y Ramones Eduardo. 2004. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus Helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica*. 14(4).
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T. J. 2006. Dairy science and technology. Ed. Taylor & Francis Group. Capítulo13: 357-385.
- Wang X.L., Shang W.J., Wang D.X. Wu L. y Tu A.H. 2009. Characterization and applications of nanofiltration membranes: State of the art. *Desalination*. 236: 316-326.
- 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.

9. ANEXOS

Anexo A: Medición de azúcares por el método de Dubois.

El contenido total de carbohidratos, puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, ya que dan un color amarillo – naranja muy estable, cuando reaccionan con fenol – ácido sulfúrico. La cantidad de color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos y puede ser medida a una longitud de onda de 490 nm.

Equipo

Tubos falcón de 15 mL

Vortex

Pipetas

Espectrofotómetro

Reactivos

Stock de lactosa de 400 mg/L

Fenol al 5%

Ácido sulfúrico concentrado

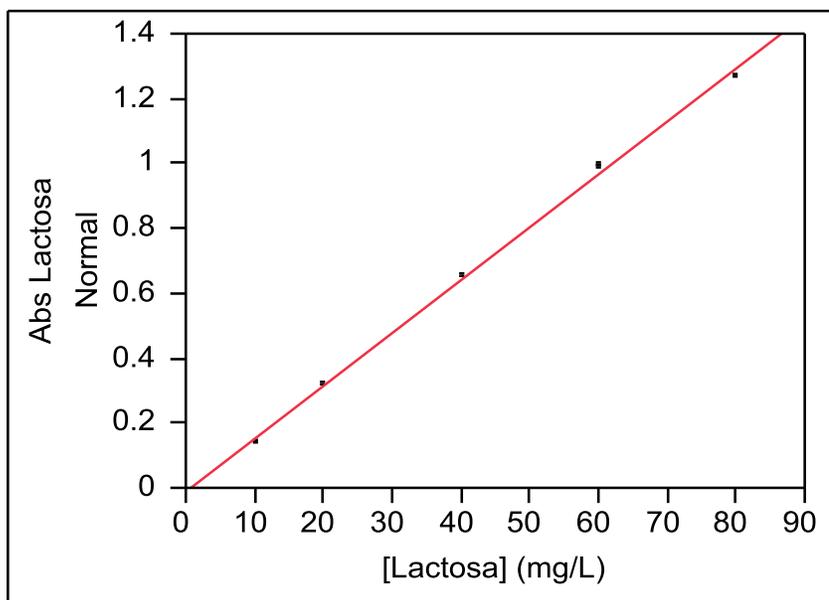
Preparación de la curva de calibración

Dilución	Bco.	1	2	3	4	5	6
Stock lactosa (μ L)	0	25	50	100	150	200	250
Agua destilada (μ L)	1000	975	950	900	850	800	750
Lactosa (mg/mL)	0	10	20	40	60	80	100

Procedimiento

Preparar en cada tubo limpio y seco las diluciones de la Tabla (1 mL de solución en total). Adicionar 0.5 mL de fenol al 5%. Rápidamente adicionar 2.5 mL de ácido sulfúrico y agitar en vortex. Dejar reposar 10 min fuera de la luz directa del sol. Poner en baño de agua 30 min a 30°C. Leer absorbancia a 490 nm. La muestra problema se debe diluir lo necesario y seguir el mismo procedimiento.

Curva de calibración:



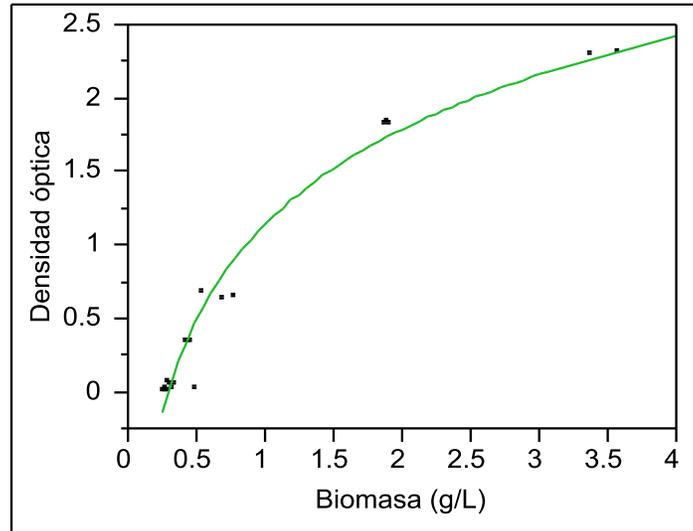
$$\text{Abs Lactosa} = -0.009625 + 0.0162625 * [\text{Lactosa}] \text{ (mg/L)}$$

Ajuste

R^2	0.998645
R^2_{aj}	0.998475

Anexo B: Curvas de calibración de biomasa, lactosa y ácido láctico

B.1. Curva de calibración para determinar la concentración de biomasa

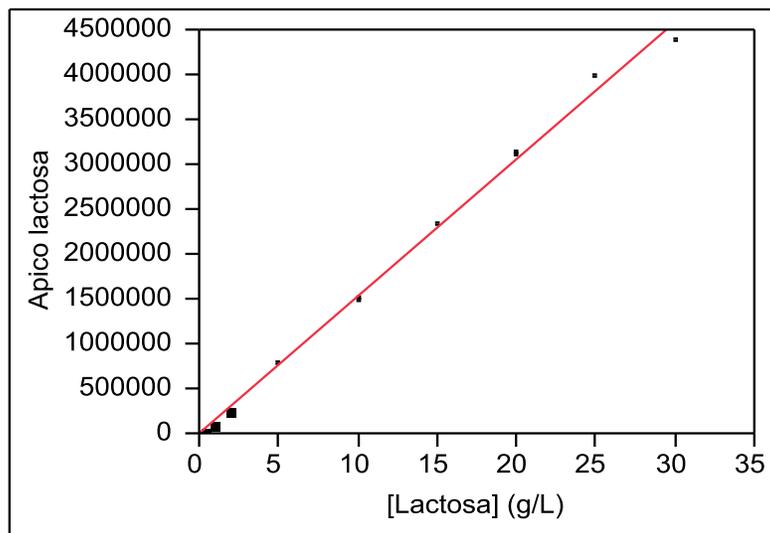


$$\text{Densidad óptica} = 1.1424237 + 0.9273226 \cdot \text{Log}(\text{Biomasa (g/L)})$$

$$R^2_{aj}$$

$$0.974806$$

B.2. Curva de calibración para determinar la concentración de lactosa

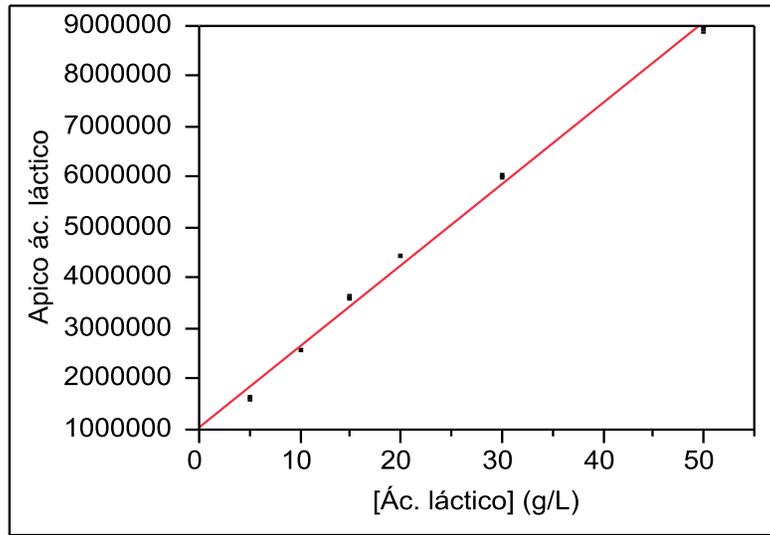


$$\text{Apico lactosa} = 2278.4211 + 152349.4 \cdot [\text{Lactosa}] \text{ (g/L)}$$

$$R^2_{aj}$$

$$0.996969$$

B.3. Curva de calibración para determinar la concentración de ácido láctico



$$\text{Apico ác. láctico} = 1026835.9 + 161090.27 \cdot [\text{Ác. láctico}] \text{ (g/L)}$$

$$R^2_{aj}$$

$$0.994885$$

Anexo C: Medición de cloruros, fosfatos y sulfatos.

C.1 Cloruros

En una solución neutra o ligeramente alcalina, el cromato de potasio indica el punto final de la titulación de cloruros con nitrato de plata. El cloruro precipita cuantitativamente en forma de cloruro de plata antes de formarse el cromato de plata rojo.

Equipo

Matraz Erlenmeyer de 250 mL

Bureta, 50 mL.

Reactivos

a) Solución indicadora de cromato de potasio: disolver 50 g de K_2CrO_4 en un poco de agua destilada. Añadir $AgNO_3$ hasta formar un precipitado rojo claro. Dejar reposar durante 12 horas, filtrar y diluir a 1 L con agua destilada.

b) Nitrato de plata 0,0141 N: disolver 2.395 g de $AgNO_3$ en agua destilada y llevar a 1 L. Valorar con una solución de $NaCl$ de concentración conocida.

c) Cloruro de sodio 0,0141 N: disolver 824 mg de $NaCl$ (secado a 140 °C) en agua destilada y llevar a 1 L.

d) Reactivos para eliminación de interferencias: Hidróxido de sodio 1N y ácido sulfúrico 1N (para llevar a pH entre 6-10, cuando sea necesario).

Procedimiento

Utilizar un volumen de muestra conocido; añadir 1 mL de solución indicadora de cromato de potasio, para luego titular con nitrato de plata de concentración conocida hasta llegar al punto final de la titulación amarillo-rosa y anotar el volumen gastado. Para valorar la concentración exacta de la solución de nitrato de plata, se toma 5 mL de la solución de cloruro de sodio 0,0141N y se sigue el mismo procedimiento que para la muestra problema.

Cálculo

$$\frac{mgNaCl}{L} = \frac{(A - B) * N * 35450}{V_m} * 1.65$$

Donde:

A: Volumen gastado de nitrato de plata en muestra problema

B: Volumen gastado de nitrato de plata en blanco

N: Normalidad del nitrato de plata

V_m: Volumen de muestra valorada

C.2 Fosfatos

El método se basa en la formación de fosfomolibdato que en presencia de ácido ascórbico se reduce a azul de molibdeno y cuya absorbancia se lee a 660 nm.

Equipo

Balanza analítica, sensibilidad 0,1 mg.

Mufla regulable a 550 ± 15°C.

Baño termorregulador.

Espectrofotómetro visible.

Cápsulas de porcelana.

Placa calefactora.

Material usual de laboratorio

Reactivos

Ácido clorhídrico al 37%.

Tampón pH 4: Pesar 34 g de acetato de sodio trihidratado, disolver en agua y mezclar con 57 mL de ácido acético glacial, completar 1 litro con agua, tener cuidado que el pH al final sea de 4

Ácido ascórbico: preparar al 1% en solución de ácido oxálico al 0,5% recién preparado.

Molibdato de amonio sulfúrico: diluir 75 mL de ácido sulfúrico en 200 mL de agua, agregar esta solución a una que contiene 25 g de molibdato de amonio disueltos en 300 mL de agua.

Solución estándar de trabajo: solución de 100 µg de fósforo por mL.

Procedimiento:

Preparación de la muestra: pesar 1 a 2 g de muestra previamente homogenizada. Precalcinar y luego calcinar a 550°C por 8 horas hasta cenizas blancas. Tratar las cenizas en el crisol a temperatura ambiente con 5 mL de agua y 5 mL de ácido clorhídrico. Cubrir con vidrio reloj y hervir cuidadosamente 5 min en placa calefactora, evitando que se seque. Transferir cuantitativamente a matraz aforado de 100 mL con ayuda de agua destilada y aforar.

Medir 5 mL de la solución muestra, agregar 10 mL de la solución tampón, 1 mL de la solución de ác. ascórbico y 5 mL de molibdato de amonio sulfúrico. Mezclar después de cada adición y aforar a 100 mL con agua. Leer la absorbancia a 660 nm a los 30 minutos exactos desde que se adiciona el molibdato. Para preparar la curva de calibración se preparan soluciones de 0, 10, 20, 30 y 40 µg de fósforo/L y se sigue el procedimiento descrito anteriormente tanto para la curva de calibración como para las muestras problema. Usar como blanco 5 mL de la solución muestra sin agregar soluciones.

Cálculo

La concentración de las muestras se lee directamente a partir de la curva de calibración, teniendo en cuenta el factor de dilución empleado.

C.3 Sulfatos

El ion sulfato precipita en un medio con ácido acético y cloruro de bario para formar cristales de sulfato de bario. La absorbancia de la luz de la suspensión de

sulfato de bario se mide con un espectrofotómetro y la concentración de sulfatos se obtiene a partir de la curva de calibración. Las posibles interferencias presentes en la muestra se darán por la presencia de color o de sólidos suspendidos en grandes cantidades. Los sólidos suspendidos pueden ser eliminados mediante filtración.

Equipo

Agitador magnético

Espectrofotómetro

Bureta de 50 mL.

Reactivos

a) Solución buffer A: disolver 30 g de cloruro de magnesio, 5 g de acetato de sodio, 1 g de nitrato de potasio y 20 mL de ácido acético en 500 mL de agua destilada y se diluir a 1 L.

b) Cristales de cloruro de bario

c) Solución estándar de sulfatos: preparar una solución estándar a partir de 10,4 mL de ácido sulfúrico 0,02 N o disolver 0,1479 g de sulfato de sodio anhidro en agua destilada y aforar a 1 L.

Procedimiento

Tomar 20 mL de muestra y agregar 4 mL de la solución buffer A, mezclar utilizando un agitador magnético, mientras se agrega una cucharadita de cristales de cloruro de bario y a partir de aquí agitar a velocidad constante durante 1 min. Dejar en reposo 5 min y leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 420 nm. Para preparar la curva de calibración se preparan soluciones de 0, 10, 20, 30 y 40 mg SO_4^{2-} /L y se sigue el procedimiento descrito anteriormente tanto para la curva de calibración como para las muestras problema.

Cálculo

La concentración de las muestras se lee directamente a partir de la curva de calibración, teniendo en cuenta el factor de dilución empleado.

ANEXO D: Análisis estadístico de experimentos

D.1. Crecimiento microbiano en suero lácteo

(Análisis estadísticos asociados a las Figuras 12 y 13, Tabla 6)

Respuesta: Biomasa ganada a las 24 h

Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F Ratio
Modelo	11	0.02056408	0.001869	124.4004
Error	24	0.00036067	0.000015	Prob > F
C. Total	35	0.02092475		<.0001*

Prueba de efectos

Fuente	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
MnSO ₄	3	0.02029475	450.1608	<.0001*
MgSO ₄	2	0.00009050	3.0111	0.0681
MnSO ₄ *MgSO ₄	6	0.00017883	1.9834	0.1080

Prueba de Tukey

Concentración de MnSO₄

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
0.03	A	0.10577778
0.05	B	0.08511111
0.015	C	0.05977778
30.1	D	0.04366667

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Respuesta: Velocidad de crecimiento exponencial

Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F Ratio
Modelo	11	12.652892	1.15026	110.6241
Error	24	0.249551	0.01040	Prob > F
C. Total	35	12.902443		<.0001*

Prueba de efectos

Fuente	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
MnSO4	3	12.327247	395.1822	<.0001*
MgSO4	2	0.097721	4.6991	0.0190*
MnSO4*MgSO4	6	0.227925	3.6534	0.0102*

Prueba de Tukey

Concentración de MnSO4

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
0.03	A	2.9283333
0.05	B	2.2467778
0.015	C	1.7478889
0.1	D	1.3643333

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Concentración de MgSO4

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
0.2	A	2.1320000
0.4	A B	2.0785833
0.6	B	2.0049167

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción MnSO4*MgSO4

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
0.03,0.4	A	3.0916667
0.03,0.2	A B	2.9273333
0.03,0.6	B	2.7660000
0.05,0.2	C	2.3843333
0.05,0.4	C	2.2146667
0.05,0.6	C	2.1413333
0.015,0.6	D	1.7663333
0.015,0.4	D	1.7426667
0.015,0.2	D	1.7346667
0.1,0.2	D E	1.4816667
0.1,0.6	E	1.3460000
0.1,0.4	E	1.2653333

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

D.2. Separación de ácido láctico

(Prueba estadística asociada a las Figuras 23-28 y Tabla 15)

Respuesta: Flujo de permeado

Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado media	F Ratio
Modelo	35	25416.521	726.186	14.5051
Error	36	1802.309	50.064	Prob > F
C. Total	71	27218.830		<.0001*

Prueba de efectos

Fuente	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
pH	2	2152.544	21.4979	<.0001*
Presión	1	1694.445	33.8455	<.0001*
pH*Presión	2	522.450	5.2178	0.0102*
Membrana	1	39.859	0.7962	0.3782
pH*Membrana	2	228.566	2.2827	0.1166
Presión*Membrana	1	33.739	0.6739	0.4171
pH*Presión*Membrana	2	25.005	0.2497	0.7803
Tiempo	2	15004.705	149.8548	<.0001*
pH*Tiempo	4	268.885	1.3427	0.2731
Presión*Tiempo	2	322.329	3.2192	0.0517
pH*Presión*Tiempo	4	100.519	0.5019	0.7345
Membrana*Tiempo	2	4747.335	47.4125	<.0001*
pH*Membrana*Tiempo	4	167.847	0.8382	0.5101
Presión*Membrana*Tiempo	2	13.904	0.1389	0.8708
pH*Presión*Membrana*Tiempo	4	94.391	0.4714	0.7564

Prueba de t´student

Presión

$\alpha=0.050$

Nivel		Media CM
300	A	52.916667
150	B	43.214306

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey

pH

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
2.5	A	54.732125
3.5	B	48.125042
5	C	41.339292

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción pH*Presión

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
2.5,300	A	63.392833
3.5,300	B	51.071417
2.5,150	B C	46.071417
3.5,150	B C	45.178667
5,300	B C	44.285750
5,150	C	38.392833

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Tiempo

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
5	A	65.892875
10	B	47.767833
20	C	30.535750

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción Membrana*Tiempo

Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
1,5	A	75.535750
2,5	B	56.250000
2,10	B C	49.464250
1,10	C D	46.071417
2,20	D	40.714333
1,20	E	20.357167

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Respuesta %Retención de lactosa

Análisis de varianza

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado media	F Ratio
Modelo	35	6567.0190	187.629	26.9021
Error	36	251.0822	6.975	Prob > F
C. Total	71	6818.1011		<.0001*

Prueba de efectos

Fuente	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
pH	2	302.1997	21.6646	<.0001*
Presión	1	21.8648	3.1350	0.0851
pH*Presión	2	9.7073	0.6959	0.5052
Membrana	1	5261.0718	754.3291	<.0001*

Fuente	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
pH*Membrana	2	143.8223	10.3106	0.0003*
Presión*Membrana	1	13.9824	2.0048	0.1654
pH*Presión*Membrana	2	17.7773	1.2744	0.2919
Tiempo	2	470.1000	33.7013	<.0001*
pH*Tiempo	4	12.9677	0.4648	0.7611
Presión*Tiempo	2	2.2164	0.1589	0.8537
pH*Presión*Tiempo	4	0.2946	0.0106	0.9998
Membrana*Tiempo	2	284.3273	20.3833	<.0001*
pH*Membrana*Tiempo	4	14.1626	0.5077	0.7304
Presión*Membrana*Tiempo	2	5.6665	0.4062	0.6692
pH*Presión*Membrana*Tiempo	4	6.8584	0.2458	0.9103

Prueba de t´student

Membrana
Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
2	A	97.422222
1	B	80.325972

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey

pH
Alfa = 0.050

Nivel		Media CM
5	A	91.291333
3.5	B	89.048792
2.5	C	86.282167

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción pH*Membrana
Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
5,2	A	98.157167
3.5,2	A	97.503333
2.5,2	A	96.606167
5,1	B	84.425500
3.5,1	C	80.594250
2.5,1	D	75.958167

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Tiempo
Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
5	A	91.729750
10	B	89.364000
20	C	85.528542

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción Membrana*Tiempo

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
2,5	A	97.947583
2,10	A	97.716833
2,20	A	96.602250
1,5	B	85.511917
1,10	C	81.011167
1,20	D	74.454833

Respuesta %Recuperación de ácido láctico

Análisis de varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Ratio
Modelo	35	32646.788	932.765	81.8508
Error	36	410.253	11.396	Prob > F
C. Total	71	33057.042		<.0001*

Prueba de efectos

Fuente	GL	Suma de cuadrados	F Ratio	Prob > F
pH	2	2991.796	131.2661	<.0001*
Presión	1	780.553	68.4941	<.0001*
pH*Presión	2	131.602	5.7741	0.0067*
Membrana	1	58.711	5.1520	0.0293*
pH*Membrana	2	5.631	0.2470	0.7824
Presión*Membrana	1	11.963	1.0498	0.3124
pH*Presión*Membrana	2	14.900	0.6538	0.5262
Tiempo	2	26230.849	1150.887	<.0001*
pH*Tiempo	4	336.307	7.3778	0.0002*
Presión*Tiempo	2	28.127	1.2341	0.3031
pH*Presión*Tiempo	4	9.606	0.2107	0.9308
Membrana*Tiempo	2	1998.425	87.6816	<.0001*
pH*Membrana*Tiempo	4	19.291	0.4232	0.7908
Presión*Membrana*Tiempo	2	20.602	0.9039	0.4140
pH*Presión*Membrana*Tiempo	4	8.423	0.1848	0.9448

Prueba t´student

Presión

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
300	A	52.887000
150	B	46.301861

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Membrana

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
2	A	50.497444
1	B	48.691417

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey

pH

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
2.5	A	56.593542
3.5	B	51.153375
5	C	41.036375

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción pH*Presión

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
2.5,300	A	58.003833
3.5,300	A	55.677750
2.5,150	A	55.183250
3.5,150	B	46.629000
5,300	B	44.979417
5,150	C	37.093333

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Tiempo

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
20	A	74.378125
10	B	46.465542
5	C	27.939625

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción pH*Tiempo

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
2,5,20	A	84.133125
3,5,20	B	77.259000
5,20	C	61.742250
2,5,10	D	52.770625
3,5,10	D	47.669375
5,10	E	38.956625
2,5,5	F	32.876875
3,5,5	F	28.531750
5,5	G	22.410250

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Interacción Membrana*Tiempo

Alfa = 0.05

Nivel		Media CM
2,20	A	82.578583
1,20	B	66.177667
1,10	C	47.909583
2,10	C	45.021500
1,5	D	31.987000
2,5	E	23.892250

Niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.