

Estudio de la valorización de lactosuero ácido mediante pretratamiento basado en etapas de desproteinización, clarificación y concentración, para su uso como sustrato en la fermentación láctica

Juan Carlos González Téllez

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Magister en Ingeniería Química

Director

Prof. Carlos Jesús Muvdi Nova
Ingeniero Químico, MSc., PhD.

Codirectora

Claudia Milena Mantilla Camacho
Microbióloga Industrial, Esp.

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2019

A mis padres Elva M. & Carlos A.

A mis hermanas Suchis, Yinnis, Lili y Maggy.

A mi hermosa y amada sobrina Anamaría.

A todos mis seres queridos.

Por su amor incondicional, por recordarme a cada instante la grandeza y el significado de la Familia, por la fortuna de tenerlos a mi lado...

Juan C. González Téllez

Agradecimientos

A Dios y a la vida, por la oportunidad de vivir y culminar con éxito esta enriquecedora experiencia de vida.

Al Prof. Dr Carlos Jesús Muvdi Nova por sus permanentes enseñanzas, por su ejemplo de vida y de desempeño profesional, por la confianza depositada en mí y por entregarlo todo por el crecimiento personal de cada uno de sus estudiantes.

A la microbióloga Esp. Claudia Milena Mantilla Camacho por su aporte fundamental al desarrollo de este proyecto, por la valiosa formación recibida desde el componente microbiológico y por su calidad humana.

A la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, a sus directivos, maestros, técnicos de laboratorio, administrativos y personal de apoyo, por contribuir desde cada una de sus áreas al desarrollo efectivo de cada proceso.

Al *Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA* por el compromiso durante la fase experimental del proyecto, y a todos sus integrantes por su amistad y colaboración.

Al *Servicio Nacional de Aprendizaje Sena - Centro de Atención al Sector Agropecuario C.A.S.A*, por su disponibilidad para la cooperación institucional, y para el trabajo conjunto en proyectos con impacto regional.

Al *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias)* y la *Gobernación de Santander* por el financiamiento de mis estudios de Maestría (beca Convocatoria 771).

A Sergio, Iván, Jorge, Diana, Astrid y Lucía por todas las experiencias vividas, por los gratos momentos y el trabajo compartido.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	14
1. Objetivos.....	29
1.1 Objetivo General	29
1.2 Objetivos Específicos	29
2. Metodología	30
2.1. Fase 1: Evaluación de las etapas de precipitación de proteínas, clarificación y concentración por evaporación de película descendente al vacío como estrategia de pretratamiento del lactosuero.....	30
2.1.1. Precipitación térmica y ácida de las proteínas del lactosuero.....	30
2.1.2. Clarificación.....	30
2.2. Fase 2: Caracterización de la fermentación de lactosueros pretratados en cuanto a sus productos de fermentación rendimientos y parámetros cinéticos.	32
2.2.1. Fermentaciones con lactosueros pretratados y con el medio de referencia.....	32
2.2.2. Fermentaciones con lactosueros concentrados.....	34
2.3. Fase 3: Análisis a través de modelamiento y simulación de la fermentación láctica de lactosueros pretratados.	34
2.4. Materiales, métodos experimentales y de cuantificación.	35
2.4.1. Materiales e insumos.	35
2.4.2. Métodos experimentales.	35
2.4.3. Métodos de cuantificación..	36
3. Análisis y discusión de resultados	37

3.1. Fase 1: Evaluación de las etapas de precipitación de proteínas, clarificación y concentración por evaporación de película descendente al vacío como estrategia de pretratamiento del lactosuero.....	37
3.1.1. Desnaturalización térmica y ácida.....	37
3.1.2. Clarificación en filtro prensa.....	40
3.1.3. Concentración por evaporación de película descendente al vacío.	43
3.2 Fase 2: Caracterización de la fermentación de lactosueros pretratados en cuanto a sus productos de fermentación, rendimientos y parámetros cinéticos.	47
3.2.2. Fermentaciones con lactosueros pretratados con control de pH..	49
3.2.3. Fermentaciones con lactosuero concentrado.....	56
3.3 Fase 3: Análisis de la fermentación láctica de lactosueros pretratados a través de modelamiento y simulación.....	63
3.3.1. Modelamiento en modo de operación <i>batch</i>	64
4. Conclusiones	74
5. Recomendaciones.....	76
Referencias Bibliográficas.....	78

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Características de algunos microorganismos productores de ácido láctico.....	22
Tabla 2. Estudios para producción de L-ácido láctico con diferentes cepas de <i>L. casei</i> , distintas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y distintos modos de operación	26
Tabla 3. Distintas expresiones usadas para μ según consideraciones de inhibición.....	28
Tabla 4. Composición del lactosuero antes y después de la desproteinización y del requesón separado.....	38
Tabla 5. Estimación de las resistencias a la filtración de lactosuero desproteinizado	41
Tabla 6. Caracterización del lactosuero al inicio y al final de cada ciclo por el filtro prensa.....	43
Tabla 7. Caracterización de los concentrados de lactosuero obtenidos	45
Tabla 8. Estandarización del tamaño del inóculo en el medio de precultivo mediante medición de D.O. _{660nm} y recuento de UFC/cm ³	47
Tabla 9. Resumen de parámetros de fermentación sin control de pH con <i>L. casei</i> ATCC 393 a 37°C, 130 rpm y pH inicial de 6,5.....	49
Tabla 10. Duración de las fases de crecimiento de <i>L. casei</i> ATCC 393 en las fermentaciones a 37°C, 130 rpm, con control de pH	51
Tabla 11. Crecimiento máximo alcanzado en términos de UFC/cm ³ , D.O. _{660nm} y peso seco; velocidades específicas de crecimiento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) y tiempos de duplicación (TD).....	51
Tabla 12. Parámetros de crecimiento obtenidos en estudios empleando cepas del género <i>Lactobacillus</i> , lactosuero y azúcares comerciales como sustrato	53
Tabla 13. Parámetros de consumo de lactosa y producción de lactato en fermentaciones con <i>L. casei</i> ATCC 393 a 37°C, 130 rpm y pH controlado.....	55

Tabla 14. Concentración de sólidos solubles del lactosuero empleado (°Brix) y concentración inicial de lactosa (S_0) en los medios de fermentación.....	56
Tabla 15. Velocidades específicas de crecimiento máximas para los medios de fermentación 1 y 2, con <i>L. casei</i> ATCC 393, a 37°C, pH controlado y 130 rpm.	59
Tabla 16. Comparación entre fermentaciones reportadas en la literatura y el presente estudio para concentraciones de fuente de carbono cercanas a 100 g/dm ³	61
Tabla 17. Resumen parámetros de producción de lactato y consumo de lactosa en fermentaciones con <i>L. casei</i> ATCC 393, a 37°C, pH controlado y 130 rpm	62
Tabla 18. Optimización de parámetros cinéticos en los distintos medios de fermentación.....	68
Tabla 19. Parámetros cinéticos obtenidos en diversos trabajos, en fermentaciones lácticas con distintos microorganismos y sustratos	70
Tabla 20. Comparación parámetros productivos entre modos de operación <i>batch</i> y <i>fed-batch</i> para las fermentaciones con lactosuero concentrado a S_0 de 52,3 g/dm ³ y 95,7 g/dm ³	73

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Generación de lactosuero en Colombia derivada de la producción de quesos	14
Figura 2. Producción nacional e importación de ácido láctico y lactatos.	17
Figura 3. Alternativas de procesamiento del lactosuero.	18
Figura 4. Esquema de las vías química y biotecnológica de obtención de ácido láctico	19
Figura 5. Resumen de la ruta metabólica <i>Embden-Meyerhof-Parnas</i>	22
Figura 6. Cuadro metodológico	31
Figura 7. Equipos utilizados en el pretratamiento del lactosuero	36
Figura 8. a) Lactosuero antes de iniciar la desproteinización y b) lactosuero finalizada la desproteinización.	37
Figura 9. Curvas de filtración de lactosuero desproteinizado	40
Figura 10. Torta de filtración obtenida para lactosuero con a) carga de proteína retirada en la etapa de desnaturalización y b) carga de proteína completa	42
Figura 11. Evolución de los °Brix (a) y el FCV (b) en función del tiempo de operación en la concentración de lactosuero desproteinizado/clarificado.....	44
Figura 12. Caracterización bromatológica de los concentrados del Lote 1 de lactosuero.	46
Figura 13. Concentrados de lactosuero a diferentes FCV.....	46
Figura 14. Turbidez de los concentrados de lactosuero obtenidos.	47
Figura 15. a) Concentraciones de lactosa, ácido láctico y biomasa; b) evolución del pH y D.O. _{660nm} en fermentación de lactosa comercial sin control de pH.	48
Figura 16. Cinéticas de crecimiento microbiano de <i>L. casei</i> ATCC 393 en fermentaciones a 37°C, 130 rpm, con control de pH	50

Figura 17. Consumo de lactosa y producción de lactato en las fermentaciones por duplicado con <i>L. casei</i> ATCC 393 a 37°C, 130 rpm y pH controlado con varios sustratos	54
Figura 18. Crecimiento microbiano en términos de D.O. _{660nm} y concentración másica celular (X), a partir de lactosuero concentrado con varios S ₀	57
Figura 19. Aspecto final de los caldos de fermentación en las pruebas con lactosuero concentrado para la prueba original y duplicado del medio 2.....	58
Figura 20. Ajuste lineal entre la concentración inicial de lactosa en el lactosuero y los valores máximos de D.O. _{660nm} y peso seco en fermentaciones con <i>L. casei</i> ATCC 393	59
Figura 21. Cinéticas de consumo de lactosa y producción de lactato en el medio 1 a) original b) duplicado y medio 2 c) original, d) duplicado.....	60
Figura 22. Cinéticas de fermentación experimentales (exp) y modeladas (mod) en fermentación en modo <i>batch</i> para el medio de referencia a partir de lactosa grado analítico con (S ₀ de 45 g/dm ³)	66
Figura 23. Cinéticas de fermentación experimentales (exp) y modeladas (mod) en fermentación en modo <i>batch</i> para el medio a partir de lactosuero concentrado con S ₀ de 52,3 g/dm ³	67
Figura 24. Cinéticas de fermentación experimentales (exp) y modeladas (mod) en fermentación en modo <i>batch</i> para el medio a partir de lactosuero concentrado con S ₀ de 95,7 g/dm ³	67
Figura 25. Perfiles de concentración de producto, sustrato y biomasa en simulación en modo <i>fed-batch</i> para el medio con lactosuero concentrado a 52,3 g/dm ³ de lactosa	72
Figura 26.. Perfiles de concentración de producto, sustrato y biomasa en simulación en modo <i>fed-batch</i> para el medio con lactosuero concentrado a 95,7 g/dm ³ de lactosa	72

RESUMEN

TÍTULO: Estudio de la valorización de lactosuero ácido mediante pretratamiento basado en etapas de desproteínización, clarificación y concentración, para su uso como sustrato en la fermentación láctica.*

AUTOR: Juan Carlos González Téllez. **

PALABRAS CLAVE: Lactosuero, valorización, pretratamiento, desproteínización, clarificación, concentración, fermentación, ácido láctico, lactato.

DESCRIPCIÓN:

En el presente trabajo se estudió la valorización de lactosuero ácido mediante un esquema de pretratamiento para su uso como sustrato en fermentación láctica. Se observó la conveniencia de las etapas propuestas, al conseguirse la reducción del 40% de la proteína del lactosuero y recuperarla para ser usada en su forma hidrolizada como fuente de nitrógeno de bajo costo en las fermentaciones (proyecto de pregrado), además de conseguir lactosueros concentrados hasta un Factor de Concentración Volumétrica (FCV) de 4.

Se evaluó la fermentación a partir de lactosuero: entero (sin tratar), desproteínizado y concentrado, todos a un FCV de 1, y se compararon con fermentaciones de referencia a partir de lactosa grado analítico, encontrándose en todos los medios un consumo completo de la lactosa disponible con rendimientos producto sustrato ($Y_{p/s}$) entre $0,77 \pm 0,03$ g/g y $0,92 \pm 0,03$ g/g para los medios basados en lactosuero y $0,88 \pm 0,04$ g/g para el medio de referencia. Las fermentaciones con lactosuero alcanzaron productividades más altas entre $1,25 \pm 0,21$ y $1,65 \pm 0,35$ g/dm³.h, en comparación con $0,95 \pm 0,35$ g/dm³.h para el medio de referencia. Las pruebas con lactosuero concentrado a un FCV de 2 permitieron aumentar hasta 1,7 veces la productividad con respecto a los medios a FCV de 1, con rendimientos superiores a 0,9 g/g y concentraciones de lactato de hasta 95,3 g/dm³. Para el FCV de 4, se presentó un fuerte efecto de floculación con considerables reducciones en $Y_{p/s}$ (0,5g/g) y producciones máximas de hasta 111,5 g/dm³ de lactato de calcio.

El modelamiento y simulación de las fermentaciones con lactosuero procesado en modo *fed-batch* mostró un considerable descenso en la productividad de 44% y 67% para fermentaciones con lactosuero procesado a un FCV de 1 y de 2 respectivamente, con lo cual es preferible el escalamiento de las fermentaciones con lactosuero a un FCV de 2 como estrategia más favorable.

* Trabajo de investigación- Maestría en Ingeniería Química

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.

Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Ingeniero Químico, MSc., PhD.

Codirectora: Claudia Milena Mantilla Camacho. Microbióloga Industrial, Esp.

ABSTRACT

TITLE: Valuation study of acid whey by pretreatment stages of deproteinization, clarification and concentration, to be used as a substrate in lactic fermentation. *

AUTHOR: Juan Carlos González Téllez. **

KEYWORDS: Whey, valuation, pretreatment, deproteinization, clarification, concentration, fermentation, lactic acid, lactate.

DESCRIPTION:

In this work, the valuation of acid whey was studied by a pretreatment scheme to be used as a substrate in lactic fermentation. The convenience of the proposed stages was observed, as the 40% reduction of the whey protein was achieved and recovered to be used in its hydrolyzed form as a low-cost source of nitrogen in fermentations (undergraduate project), in addition to obtaining whey concentrated to a Volumetric Concentration Factor (VCF) of 4.

Fermentation was evaluated from the whey: whole (untreated), deproteinized and concentrated, all of them at VCF of 1, and then compared with reference fermentations of lactose reagent grade, finding complete consumption of the available lactose by all the media, with substrate product yield coefficients ($Y_{p/s}$) between 0.77 ± 0.03 g/g and 0.92 ± 0.03 g/g for the whey-based media and 0.88 ± 0.04 g/g for the reference medium. Whey fermentations reached higher productivities, between 1.25 ± 0.21 and 1.65 ± 0.35 g/dm³.h, compared with 0.95 ± 0.35 g/dm³.h for the reference medium. Tests with concentrated whey, at VCF of 2, allowed to increase productivity up to 1.7 times compared to the media at VCF of 1, showing yields greater than 0.9 g/g and lactate concentrations up to 95.3 g/dm³. For the VCF of 4, a strong flocculation effect was presented with remarkable reductions in $Y_{p/s}$ (0.5 g/g) and maximum productions up to 111.5 g/dm³ of calcium lactate.

The modeling and simulation of processed whey fermentations in *fed-batch* mode, showed a considerable decrease in productivity of 44% and 67% for fermentations with processed whey at VCF of 1 and 2 respectively, therefore, scaling-up the whey fermentations with VCF of 2 is advisable as the most favorable strategy.

* Research Work - Master's Degree in Chemical Engineering

** Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering

Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Ingeniero Químico, MSc., PhD.

Co-director: Claudia Milena Mantilla Camacho. Industrial Microbiologist, Spc.

Introducción

La industria de los lácteos en Colombia ha venido mostrando en los últimos años un crecimiento importante, mejorando la diversidad de productos y aumentando los niveles de producción tanto de leche para consumo directo como de sus derivados, siendo los quesos los que mayor beneficio económico otorgan. En Colombia la producción de quesos es muy importante para el sector, considerando que su consumo aumenta año tras año y que en respuesta a este comportamiento se registra una marcada tendencia a incrementar su producción, como lo muestran las cifras del DANE representadas en la Figura 1.

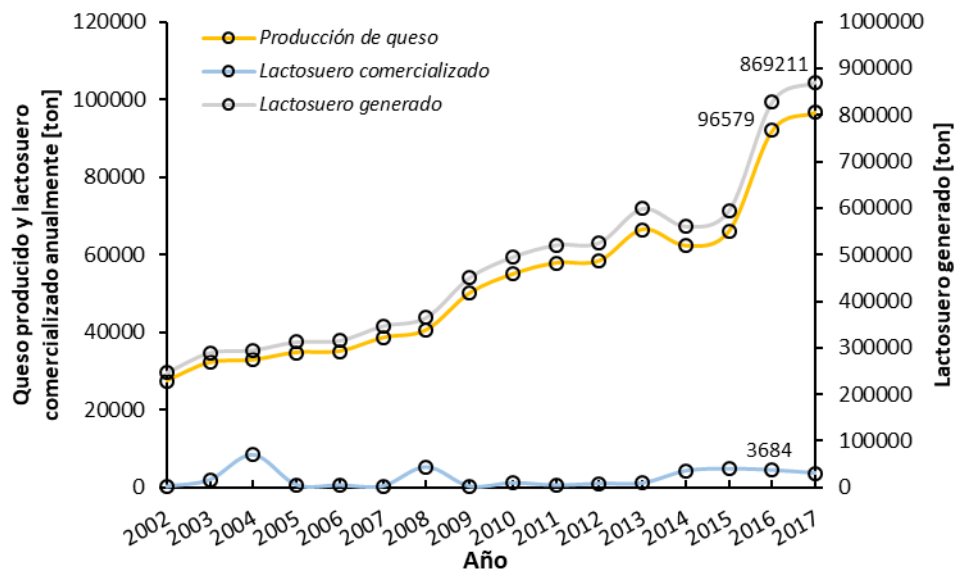


Figura 1. Generación de lactosuero en Colombia derivada de la producción de quesos (DANE, 2002-2017).

No obstante, directamente relacionado a este crecimiento está la masiva generación de lactosuero, teniendo en cuenta que en promedio, el 90% de la leche empleada en la elaboración de quesos pasa a ser parte de este subproducto, en el cual se retienen cerca del 55% de los nutrientes de la leche, principalmente lactosa (4,5-5% p/v), proteínas solubles (0,6-0,8% p/v), lípidos (0,4-0,5% p/v) y sales minerales (8 -10% extracto seco) (Parra, 2009). La generación intensiva de este subproducto es una de las principales problemáticas que afectan a la industria

láctea en todo el mundo, ya que desde el punto de vista productivo se generan pérdidas al desechar más de la mitad de los componentes de la leche, y aún más grave, su impacto sobre el medio ambiente cuando es vertido sin ningún tipo de tratamiento a las fuentes hídricas y suelos. Tradicionalmente, el lactosuero que es aprovechado se ha utilizado como alimento de animales y en la industria de alimentos en los sectores de cárnicos, panadería y bebidas hidratantes (García, Arrázola, & Villalba, 2013). Sin embargo, algunas de estas aplicaciones se ven limitadas por su alto contenido de lactosa, ya que una parte considerable de la población presenta en su organismo deficiencias para la asimilación de este componente. Así mismo, en estas aplicaciones la transformación del lactosuero no genera el valor agregado que se esperaría, teniendo en cuenta la importancia de sus componentes.

La integración de nuevas tecnologías en los esquemas de producción de procesos tan tradicionales como los desarrollados en la industria láctea, ha venido permitiendo un mayor aprovechamiento de la materia prima y de los productos primarios y secundarios obtenidos de estas actividades, generando un impacto positivo en la sostenibilidad económica y ambiental de los sectores en los cuales se implementa. La alta disponibilidad de lactosa en el suero y la presencia de otros nutrientes que estimulan el crecimiento microbiano, hacen de éste un sustrato con un interesante potencial para la producción de diferentes productos obtenidos en procesos biotecnológicos por vía fermentativa, agregando mayor valor a este subproducto (Bosco, Carletto & Marmo, 2018). Una de estas alternativas es la producción de ácido láctico, producto con un mercado muy atractivo a nivel nacional e internacional, descubierto en el año 1780 por el químico sueco, Carl Scheele y producido industrialmente vía fermentativa en los Estados Unidos desde el año 1881 (Benninga, 1990).

En la actualidad, es ampliamente utilizado como materia prima en industrias como la de alimentos (conservante y producción de bebidas), industrias de cuero y textiles, industria farmacéutica y plásticos biodegradables, lo cual lo ha llevado a posicionarse como uno de los compuestos químicos obtenidos microbiológicamente con mayor volumen de producción, en el orden de las 490 000 t anuales a nivel mundial, concentrándose cerca del 75% de su producción en las compañías *Galactic*® (Bélgica), *Carbion*® (Holanda), *Cargill incorporated*® (E.E.U.U.) y *Archer Daniels Midland Company*® (E.E.U.U.) (Miller *et al.*, 2017).

De la misma manera, las sales del ácido láctico o lactatos, producidos durante la fermentación al controlar el pH, son de interés industrial. El lactato de calcio por su parte, es utilizado en la producción de polvos de hornear, enriquecimiento de bebidas y como fuente de calcio en fármacos; el lactato de sodio como aditivo en productos lácteos y de confitería, conservante en la industria cárnica y en la elaboración de ciertos fármacos, mientras que el lactato de amonio es usado en la industria cosmética en la elaboración de cremas y lociones para la piel (Hofvendahl & Hägerdal, 2000), siendo las sales posibles alternativas para la valorización del lactosuero dentro del mismo proceso fermentativo. En nuestro país las cifras del DANE muestran un importante consumo de ácido láctico y de lactatos de sodio y calcio, junto con una producción nacional casi nula de los mismos, por lo cual toma importancia el realizar estudios para promover su producción, considerando la alta disponibilidad de materia prima para tal fin (ver Figura 2).

No obstante, todas estas aplicaciones requieren un producto final de cierto grado de pureza (ej. 85% en alimentos), lo cual se hace difícil cuando se emplean materias primas sin ningún tipo de tratamiento, ya que componentes diferentes a la lactosa pueden promover la formación de productos no deseados o incluso inhibir los microorganismos responsables de la transformación

de la lactosa a ácido láctico, razón por la cual toman gran importancia las etapas de pretratamiento de la materia prima empleada en busca de mejorar aspectos productivos del proceso y facilitar posteriores etapas de purificación (Plata, Ramírez, & Riaño, 2012).

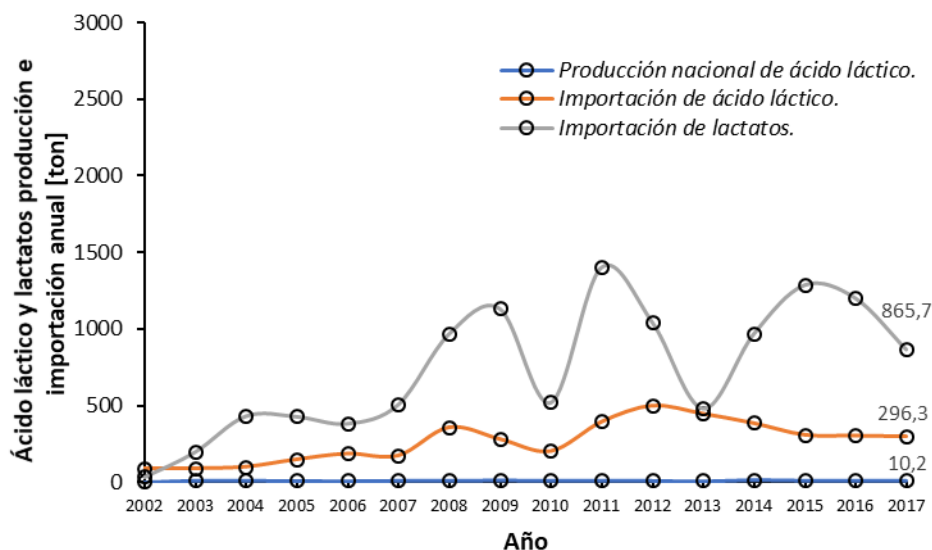


Figura 2. Producción nacional e importación de ácido láctico y lactatos. (DANE, 2002-2017).

La importancia de los componentes presentes en el lactosuero junto con su masiva producción a nivel mundial, han despertado en las últimas décadas un creciente interés hacia el estudio de tecnologías y mecanismos que le den una mayor gama de opciones para su aprovechamiento. Es así como la concentración, el fraccionamiento de sólidos y la conversión de sus constituyentes (por vía biotecnológica o química) a productos de mayor utilidad, son las principales estrategias para su procesamiento, aspecto mostrado en la Figura 3.

Al ser una solución rica en lactosa, el lactosuero presenta un muy buen potencial para ser empleado como sustrato en procesos fermentativos, ya sea para la producción de biomasa microbiana o de algún metabolito de interés como los mostrados en la Figura 3 (Hofvendahl & Hågerdal, 2000).

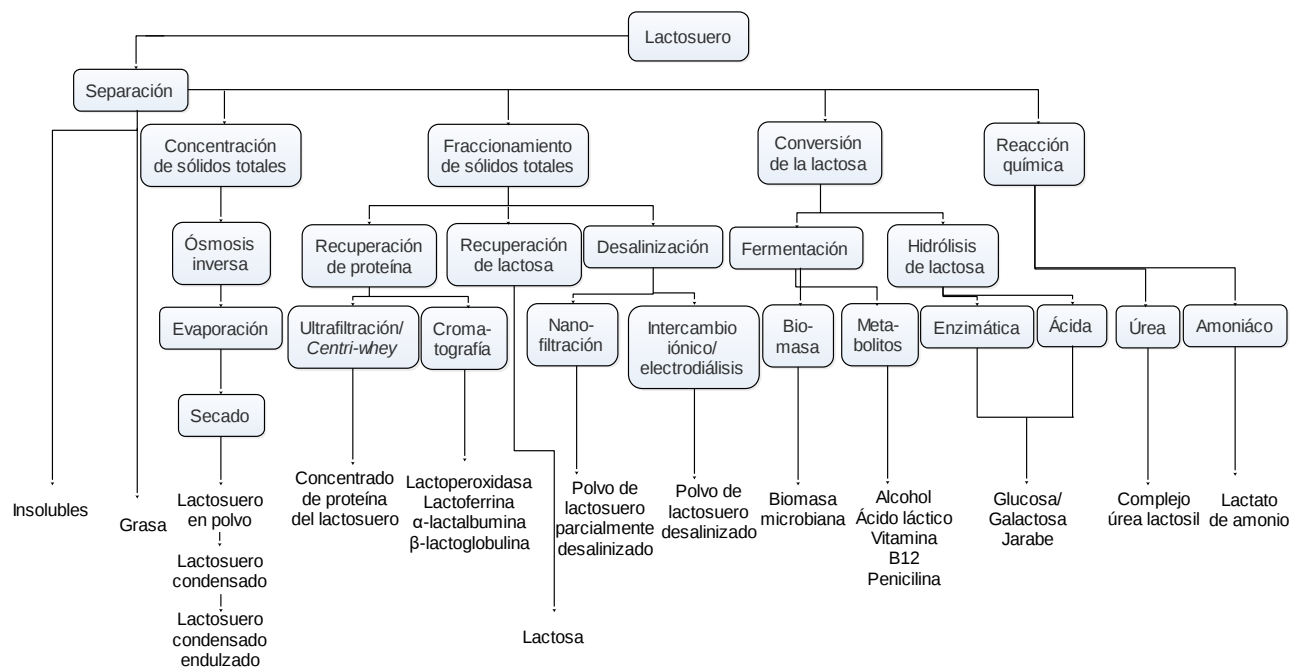


Figura 3. Alternativas de procesamiento del lactosuero. Modificado de Bylund (2015).

El ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), metabolito de gran interés, es una de las moléculas ópticamente activas más pequeñas de la naturaleza, encontrándose los isómeros, dextrógiro (D-) y levógiro (L+). En la industria de los alimentos el ácido láctico (L+) es el más utilizado; su forma (D-) puede ser tóxica en el organismo humano en ciertas concentraciones. Como se muestra en la Figura 4, este compuesto puede ser obtenido por vía química, pero en una mezcla de sus dos isómeros (aproximadamente en igual proporción), lo cual es su principal desventaja, mientras que, por vía biotecnológica, es posible la obtención de ácido láctico ópticamente puro; dependiendo del microorganismo, el sustrato y las condiciones de operación dispuestas dentro del fermentador (Akerberg & Zacchi, 2000).

Para la conversión biotecnológica del lactosuero a ácido láctico, se hacen necesarias y deseables ciertas etapas de pretratamiento. En primer lugar, la literatura reporta para estudios a

escala laboratorio, la desnaturalización (térmica y/o ácida) de las proteínas del lactosuero para inducir su precipitación, y filtraciones a pequeña escala (con papel de filtro) para separar el material insoluble generado, mientras que etapas posteriores de concentración y secado pueden utilizarse para mejorar la estabilidad del producto y sus volúmenes de operación y almacenamiento.

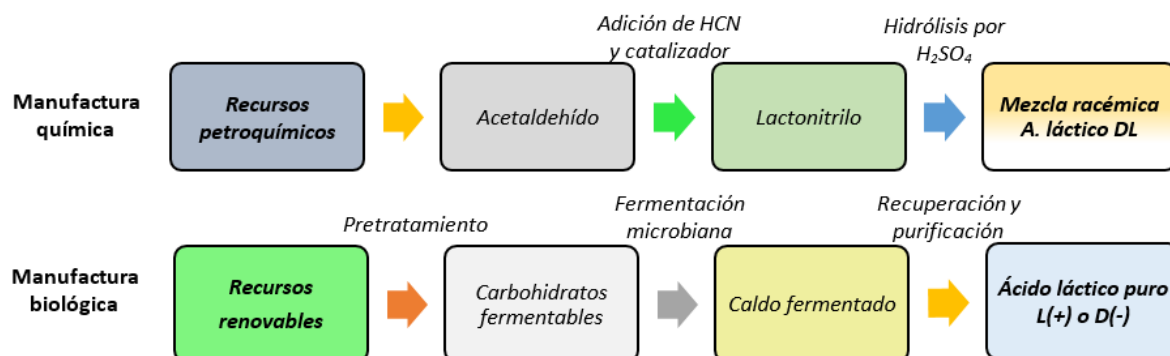


Figura 4. Esquema de las vías química y biotecnológica de obtención de ácido láctico. Modificado de Ghaffar *et al.* (2014).

En cuanto a las etapas de pretratamiento, varios estudios de fermentaciones utilizando lactosuero como sustrato, como los de Amrane (2001), Ríos (2011), García (2011), García, Arrázola & Villalba (2013), realizan la precipitación y filtración de proteínas para facilitar primordialmente, mediciones asociadas al crecimiento microbiano como densidad óptica (D.O.) o peso seco, además de reducir su efecto espumante. Por otra parte, es conocido el interés hacia la utilización de las proteínas del lactosuero en la formulación de suplementos nutricionales, sin embargo, otra potencial aplicación es su utilización en forma hidrolizada como fuente de nitrógeno en fermentaciones lácticas (Krischke *et al.*, 1991), razón por la cual sería conveniente separar la mayor cantidad de proteína en esta etapa. Puente *et al.* (2010), evaluaron el efecto de la temperatura, la acidez (utilizando ácido cítrico) y el tiempo de acción, sobre la cantidad de

proteína coagulada, alcanzando los mejores resultados (49,2 g/L de proteína húmeda), a 93 °C, pH de 4,4 y tiempo de acción de 40 min.

Con relación a la concentración de lactosuero por evaporación de película descendente al vacío, es importante señalar que es una técnica que favorece la eliminación de agua por evaporación a temperaturas moderadas, mediante el contacto de una película de líquido sobre una superficie caliente a bajas presiones de operación, alcanzando altos coeficientes de transferencia de calor (2000-4000W/m².°C) (Muñoz & Solano, 2014). En el grupo CICTA, Cáceres & Mora (2017), trabajaron en la concentración de lactosuero microfiltrado en un piloto de este tipo (tubos de 1,4 m de longitud), con una temperatura de pared (T_{pared}) de 65-70°C y Presión (P) de 20 kPa, consiguiendo Factores de Concentración Volumétrica (FCV) de aproximadamente 3,6 (concentrados de hasta 18°Brix); la formación de una espuma estable impidió concentrar a un mayor nivel. Tanguy *et al.* (2016), trabajaron en la concentración de lactosuero micro y ultrafiltrado, obteniendo FCV de 7,9 y 8,6, respectivamente, bajo condiciones de presión y temperatura muy similares a las anteriores, pero en un evaporador de película descendente con una mayor superficie de evaporación (tubos de 4 m de longitud).

A pesar de que la fermentación láctica se realice desde hace ya más de 100 años a nivel industrial, hoy en día continúa su investigación, motivada hacia la optimización del proceso, buscando fermentaciones con mayores productividades y rendimientos, microorganismos más resistentes, sustratos con menor costo y por ende una mayor rentabilidad económica (García, 2011).

Una amplia variedad de microorganismos fermentativos ha sido estudiada para la producción de ácido láctico. Sin embargo, para la obtención del L-ácido láctico, las bacterias acidolácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*,

Enterococcus y cepas de hongos filamentosos, especialmente del género *Rhizopus Orizae*, se han empleado por tener una estructura afín para la síntesis de este isómero (Mirdamadi *et al.*, 2002).

Las BAL son auxotróficas, es decir, su desarrollo no se realiza si no hay determinados compuestos en el medio, en este caso algunos aminoácidos y vitaminas del complejo B, los cuales suelen suplirse utilizando una fuente orgánica de nitrógeno como el extracto de levadura (deseable, pero de mayor costo), licor de maíz, entre otras (Miller *et al.*, 2017). El pH a lo largo de las fermentaciones debe controlarse entre 5 y 7 mediante la adición de un agente neutralizante, ya sea carbonato de calcio (CaCO_3), o hidróxidos de calcio (Ca(OH)_2), sodio (NaOH) o amonio (NH_4OH), mientras que el rango de temperatura adecuado para el desarrollo del microorganismo está entre 37°C y 45°C (Vijayakumar, Thangavelu, & Rajendran, 2008).

En la literatura se reportan rendimientos cercanos 0,9 g a. láctico/g sustrato para las BAL, dependiendo de las condiciones del medio. La fracción no convertida en ácido láctico es utilizada por los microorganismos para estimular su crecimiento y mantenimiento celular, para la formación de subproductos, principalmente ácidos orgánicos (fórmico, acético y pirúvico) y etanol, todo lo anterior en el caso de especies heterofermentativas (Miller *et al.*, 2017). En la Tabla 1, se muestran las características reportadas para algunas especies de microorganismos en fermentaciones lácticas.

Como aspectos a favor de las bacterias del género *Lactobacillus*, se puede mencionar la posibilidad de seleccionar una cepa tanto homofermentativa como productora de ácido láctico L(+). Adicionalmente, debido a que muchas de sus especies son anaerobios facultativos, permiten que el proceso se lleve a cabo sin necesidad de aire en exceso, ni de una atmósfera completamente libre de oxígeno, lo cual favorece su crecimiento en matraces, con buenas

velocidades de crecimiento y formación de producto. Las especies homofermentativas siguen la ruta metabólica de la glicólisis, *Embden-Meyerhof-Parnas*, resumida en la Figura 5, en la cual la fermentación de 1 mol de glucosa resulta en 2 moles de ácido láctico y una ganancia neta de 2 ATP (Salminen & Wright, 1998).

Tabla 1.

Características fermentativas de algunos microorganismos productores de ácido láctico.

Género y especie	Homofermentativa	Heterofermentativa	Config. ácido láctico
<u>Lactobacillus</u>			
<i>L. casei</i>	✓		L(+)
<i>L. delbrueckii</i>	✓		D(-)
<i>L. lactis</i>	✓		D(-)
<i>L. bulgaricus</i>	✓		D(-)
<i>L. plantarum</i>	✓		DL
<i>L. curvatus</i>	✓		DL
<i>L. brevis</i>		✓	DL
<i>L. fermentum</i>		✓	DL
<u>Streptococcus</u>			
<i>S. cremoris</i>	✓		L(+)
<i>S. lactis</i>	✓		L(+)
<i>S. faecalis</i>	✓		L(+)
<u>Bifidobacterium</u>		✓	L(+)
<u>Rhizopus</u>		✓	L(+)
<i>R. Oryzae</i>			

Nota: Modificado de Vijayakumar *et al.* (2008).

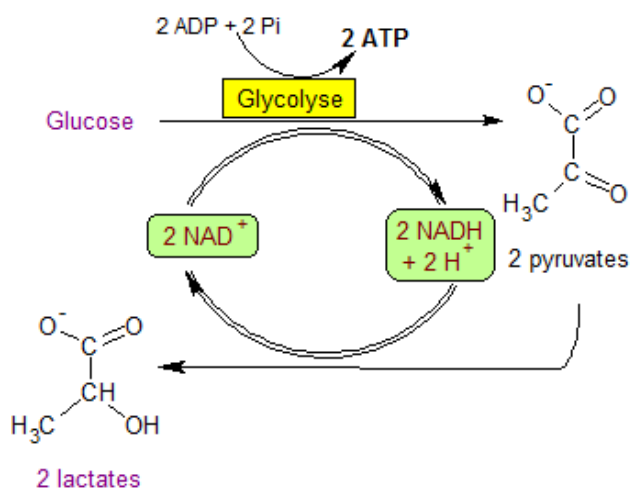


Figura 5. Resumen de la ruta metabólica *Embden-Meyerhof-Parnas* (Ríos, 2011).

Su principal desventaja es la fuerte inhibición en su crecimiento y producción a pH del medio inferior a 5, lo cual implica la adición de agentes neutralizantes, aspecto que dificulta la posterior recuperación del ácido láctico; siendo ésta la principal limitante de su producción a nivel industrial utilizando estos microorganismos (Miller *et al.*, 2017). Sin embargo, como se mencionó antes, las sales generadas en la neutralización son un producto de interés industrial, el cual podría ser atractivo desde el punto de vista económico, considerando que representaría menores costos de separación.

Por otra parte, las cepas de hongos empleadas, particularmente del género *R. Oryzae*, se caracterizan por una mayor tolerancia a los ambientes ácidos, por no requerir una fuente orgánica de nitrógeno para su crecimiento y por su capacidad amilolítica de convertir directamente el almidón en ácido láctico con buenos rendimientos. Sin embargo, presenta varias limitaciones teniendo en cuenta la considerable formación de subproductos (rendimiento menor comparado con las BAL); además, requiere oxígeno en exceso ($0,3 \text{ gO}_2/\text{dm}^3\cdot\text{h}$) y dependiendo de la morfología desarrollada en su crecimiento (micelio individual, granular y/o pellets esféricos), se generan problemas de transferencia de masa, mezclado y recuperación del producto (Miller *et al.*, 2017).

Para la producción de ácido láctico, se han utilizado diferentes tipos de materia prima como fuente de carbono, tanto medios complejos (subproductos de diferentes procesos) como azúcares simples (García, 2011). Se han reportado productos de fermentación de mayor pureza al utilizar azúcares simples de grado comercial como la glucosa, la dextrosa, sacarosa, maltosa y lactosa. Sin embargo, la viabilidad económica del proceso puede mejorar con el aprovechamiento de subproductos ricos en azúcares como materia prima de bajo costo (Ghaffar *et al.*, 2014). Es así, como materiales celulósicos, amiláceos, el lactosuero, la melaza y el licor de maíz, han sido

planteados como alternativas interesantes (Yin *et al.*, 1997; Vijayakumar, *et al.*, 2008; Rahman, *et al.*, 2011).

Así mismo, la selección de la fuente de nitrógeno orgánico, para el caso de las BAL, es un parámetro clave en el diseño y ajuste de las fermentaciones. Como se mencionó anteriormente, el extracto de levadura estimula de mejor manera el crecimiento microbiano, lo cual se ve reflejado en fermentaciones más productivas (productividad definida en g de lactato/dm³.h). No obstante, desde el punto de vista industrial, el costo de esta materia prima influye de manera importante en la viabilidad económica del proceso, siendo deseable encontrar fuentes de nitrógeno alternativas eficientes y de menor costo. En cuanto a esto, en algunos trabajos se han probado componentes como extracto de malta, hidrolizados de caseína y de proteínas del lactosuero como fuente alternativa. Krischke *et al.* (1991) reportan el uso de las proteínas hidrolizadas del lactosuero (50 g/dm³) separadas por ultrafiltración como fuente de nitrógeno para las BAL, consiguiendo rendimientos y productividades interesantes (0,86 g lactato/g lactosa y 1,64 g/dm³.h, respectivamente), pudiendo ser esta una alternativa para reducir la cantidad de extracto de levadura empleada en el proceso.

La selección del microorganismo a utilizar está directamente relacionada con el sustrato a emplear en la fermentación y más específicamente con el tipo de azúcar a ser fermentado. Diversos trabajos muestran que las cepas de *L. casei*, utilizan la lactosa como fuente de carbono, ya sea en fermentaciones en medio simple o en lactosuero para la producción de ácido láctico L(+) (García, 2011); mientras que las características fermentativas del hongo filamentoso *R. Oryzae*, en la mayor parte de trabajos han sido aprovechadas para convertir directamente el almidón en ácido láctico L(+). Pocos trabajos, como el de Chatterjee & Guha (2008), han empleado *R. Oryzae* en lactosuero como sustrato, en este caso para la producción de quitosano.

En la Tabla 2, se presenta un resumen de diferentes trabajos realizados con *L. casei*, en distintas condiciones de operación y con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

De los estudios mostrados en esta tabla, se aprecia una buena conversión de lactosa en lactato (bajo condiciones adecuadas del medio de fermentación) en comparación con los resultados obtenidos para la glucosa, azúcar simple de más fácil asimilación; el extracto de levadura estuvo relacionado con un crecimiento más rápido de los microorganismos lo cual se tradujo en mayores productividades, mientras que de las fuentes de nitrógeno alternativas que fueron evaluadas, la proteína hidrolizada del lactosuero y el extracto de malta, presentaron comportamientos interesantes para su potencial uso en las fermentaciones (Hujanen & Linko, 1996; Krischke *et al.*, 1991).

El control del pH durante el proceso es muy importante para evitar la inhibición de *L. casei*. En el trabajo de Ríos (2011), en las pruebas realizadas sin control de pH, se observó como a las 18 h de fermentación el microorganismo detuvo su producción alcanzando un bajo rendimiento de 0,25 g A. láctico/g lactosa. Similarmente, en el estudio de García (2011), utilizando *L. casei* ATCC 393, se alcanzó un rendimiento de 0,53 g A. láctico /g lactosa. Diversos estudios con *L. casei* muestran la necesidad de la adición de micronutrientes esenciales, como aquellos que contienen Mn, Mg, K y P, los cuales han demostrado ser indispensables para el crecimiento del microorganismo y la biosíntesis del ácido láctico, al promover la producción de la enzima lactato deshidrogenasa encargada de la reducción de piruvato a lactato (Krischke *et al.*, 1991).

Tabla 2.
Estudios para producción de L-ácido láctico con *L. casei*, distintas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y distintos modos de operación.

Config.	Microorganismo	Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno	L [g/dm ³]	Yp/s [g/g]	P [g/dm ³ .h]	Autor
Biorreactor 450cm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> DSM 20244	Lactosuero Ultrafiltrado 40 g/dm ³ Lactosa	Ret. sin hidrol. 50g/dm ³	34,8	0,87	0,74	Krischke <i>et al.</i> (1990)
			Ret. hidrolizado 50g/dm ³	34,4	0,86	1,64	
Biorreactor 450cm ³ Continuo	<i>L. casei</i> DSM 20244	Lactosuero Ultrafiltrado 40 g/dm ³ Lactosa	Ret. hidrolizado 50g/dm ³	33,0	0,83	2,20	Krischke <i>et al.</i> (1990)
			+E. de levadura 5g/dm ³				
Biorreactor 3dm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> DMS 20011	Glucosa 119,6 g/dm ³	Ret. hidrolizado 50g/dm ³	33,0	0,83	5,5	Vaccari <i>et al.</i> (1993)
			+ E. de levadura 5g/dm ³				
Matraz 250cm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> NRRL B-441	Glucosa 100g/dm ³	E. de levadura 30 g/dm ³	99,86	0,84	8,551	Hujanen <i>et al.</i> (1996)
Matraz 250cm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> NRRL B-441	Glucosa 100g/dm ³	E. de levadura 0,22% N	92	0,92	1,40	Buyukkileci <i>et al.</i> (2004)
			E. de malta 0,22% N	88	0,88	1,33	
Matraz 250cm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> NRRL B-441	Lactosuero comercial en polvo 50g/dm ³ Lactosa Lactosa comercial Glucosa 50 g/dm ³	Hidrolizado de caseína 0,22% N	44	0,44	0,44	Ding & Tan (2006)
				~46	0,93	1,75	
Biorreactor 5dm ³ <i>Fed-batch</i>	<i>L. casei</i> LA-04-1	Glucosa 850 g/dm ³ (sin de alimentación)	E. de levadura 10g/dm ³	~46	0,93	1,45	Garcia (2011)
				-	-	1,45	
Biorreactor 1dm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> ATCC 393	Lactosuero- desproteínización ácida 47,9 g/dm ³ Lactosa	Sulfato de amonio 5g/dm ³	22,23	0,53	1,1	Rios (2011)
Matraz 300cm ³ <i>Batch</i>	<i>L. casei</i> ATCC 334	Lactosuero 40,19 g/dm ³ Lactosa	E. de levadura 10g/dm ³	12,45	0,25	0,59	
				25,01	0,84	2,08	

Nota: L, producción de lactato; Yp/s, rendimiento producto sustrato y P, productividad.

El modelamiento de procesos biotecnológicos constituye una herramienta clave para el ajuste de condiciones de operación y en general para la optimización a bajo costo de un bioproceso, reduciendo de gran manera la carga experimental asociada a esta actividad (Ortega Quintana *et al.*, 2017). Si los modelos consideran o no las características y procesos internos en la célula, pueden ser estructurados o no estructurados; mientras que si se tienen en cuenta o no las diferencias en la población microbiana desde el punto de vista del ciclo celular (células jóvenes, en reproducción o envejecidas) el modelo puede ser segregado o no segregado (Bouguettoucha, Balannec, & Amrane, 2011).

Los modelos no estructurados y no segregados a pesar de ser el caso más sencillo de modelamiento son los más utilizados en la actualidad, gracias a que proveen una adecuada descripción del bioproceso en un amplio rango de condiciones experimentales y medios de fermentación, con una moderada complejidad matemática (Vázquez & Murado, 2008). Estos modelos representan de manera global el efecto de los procesos metabólicos al interior del microorganismo sobre el crecimiento celular, la producción de metabolitos y el consumo de sustrato. En la literatura, se han reportado varios modelos de este tipo para estudiar la producción vía fermentativa de ácido láctico por bacterias. Los modelos disponibles se han utilizado tanto para sustratos simples como para sustratos complejos como melazas, almidón, lactosuero, etc., aunque en menor cantidad para los segundos. Un buen modelo debe tener en cuenta aspectos clave como la limitación por sustrato, la inhibición por sustrato y producto, y la fracción de energía destinada para el mantenimiento celular (Nandasana & Kumar, 2008).

La principal diferencia entre los modelos utilizados radica en la expresión utilizada para poder cuantificar la velocidad específica de crecimiento microbiano (μ). La expresión de *Monod* (Ec.1) relaciona μ con la concentración de un componente esencial en el medio como la(s) fuente(s) de carbono.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{k_s + S} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde, $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad específica de crecimiento máxima y k_s es la concentración de saturación del sustrato. Esta expresión es válida bajo condiciones óptimas de crecimiento, donde no hay efectos inhibitorios por la concentración de sustrato o de producto, por tanto, es válida solo para crecimiento balanceado (Shuler & Kargi, 2000). Bajo estas circunstancias puede considerarse que las condiciones del medio están gobernadas únicamente por la concentración de sustrato. Sin embargo, si el consumo de la fuente de carbono es rápido, el incremento en la concentración de producto y la densidad celular toma un efecto muy importante sobre el crecimiento (Doran, 1998). En la Tabla 3 se presentan distintas expresiones para la velocidad específica de crecimiento que toman en cuenta efectos inhibitorios.

Tabla 3.

Distintas expresiones usadas para μ según consideraciones de inhibición.

Inhibición por sustrato (Åkerberg, Hofvendahl, Zacchi, & Hahn-Hägerdal, 1998)	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s + \frac{S^2}{k_i}}$
Inhibición de tipo exponencial por sustrato (Shah, Fan, Kao, & Erickson, 1972)	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s} \exp\left(-\frac{S}{k_i}\right)$
Término de inhibición por producto a la ec. de Monod (Nielsen & Villadsen, 1992)	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s} * \left(1 - \frac{P}{P_{\text{inh}}}\right)$
Término de inhibición por biomasa a la ec. de Monod (Altiok, Tokathi, & Harsa, 2006)	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s} * \left(1 - \frac{X}{X_{\text{inh}}}\right)$
Inhibición no competitiva por producto y sustrato (Pinelli, González-Vara, Matteuzzi, & Magelli, 1997)	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s} \frac{k_p}{P + k_p}$
Inclusión del poder tóxico de producto (Kumaran & Paruchuri, 1997).	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s} * \left(1 - \frac{P}{P_{\text{inh}}}\right)^n$
Inhibición por producto y sustrato con poderes tóxicos asociados (Altiok <i>et al.</i> , 2006)	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{S + k_s} * \left(1 - \frac{X}{X_{\text{inh}}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\text{inh}}}\right)^n$

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Estudiar la valorización de lactosuero ácido mediante pretratamiento basado en etapas de desproteinización, clarificación y concentración, para su uso como sustrato en la fermentación láctica.

1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las etapas de precipitación de proteínas, clarificación y concentración por evaporación de película descendente al vacío, como estrategia de pretratamiento del lactosuero.
- Caracterizar la fermentación láctica de lactosueros pretratados en cuanto a productos de fermentación, rendimientos y parámetros cinéticos.
- Analizar a través de modelamiento y simulación la fermentación láctica de lactosueros pretratados.

2. Metodología

En la Figura 6 se presenta el diagrama metodológico que resume las fases experimentales desarrolladas durante este proyecto de investigación.

2.1. Fase 1: Evaluación de las etapas de precipitación de proteínas, clarificación y concentración por evaporación de película descendente al vacío como estrategia de pretratamiento del lactosuero.

Esta fase estuvo compuesta de 3 subetapas en las cuales se ajustaron condiciones de operación, para proponer una estrategia de pretratamiento del lactosuero para su posterior uso como sustrato en la fermentación láctica.

2.1.1. Precipitación térmica y ácida de las proteínas del lactosuero. La precipitación de las proteínas del lactosuero se realizó bajo las siguientes condiciones: volumen de 70 dm³, pH 4,4 (utilizando como acidificante ácido láctico comercial), temperatura 93°C y tiempo 40 min (Puente *et al.*, 2010).

2.1.2. Clarificación. La clarificación del lactosuero se realizó mediante filtración en filtro prensa con el fin de separar la proteína insolubilizada anteriormente, trabajando con lotes de 20dm³, a temperatura ambiente y presión de 172,4 kPa. Tanto la torta como el filtrado se caracterizaron en cuanto a %materia seca, %proteína, %grasa, %ceniza, % lactosa, °Brix y turbidez; esta última sólo para el filtrado.

2.1.3. Concentración por evaporación de película descendente al vacío. El lactosuero desproteinizado y clarificado, se llevó hasta un FCV aproximado de 4, en un piloto de evaporación de película descendente al vacío, bajo condiciones de operación ya trabajadas en el grupo CICTA para la concentración de lactosueros ácidos, temperatura de alimentación de 70°C, presión de 20 kPa y lotes de 30 dm³.

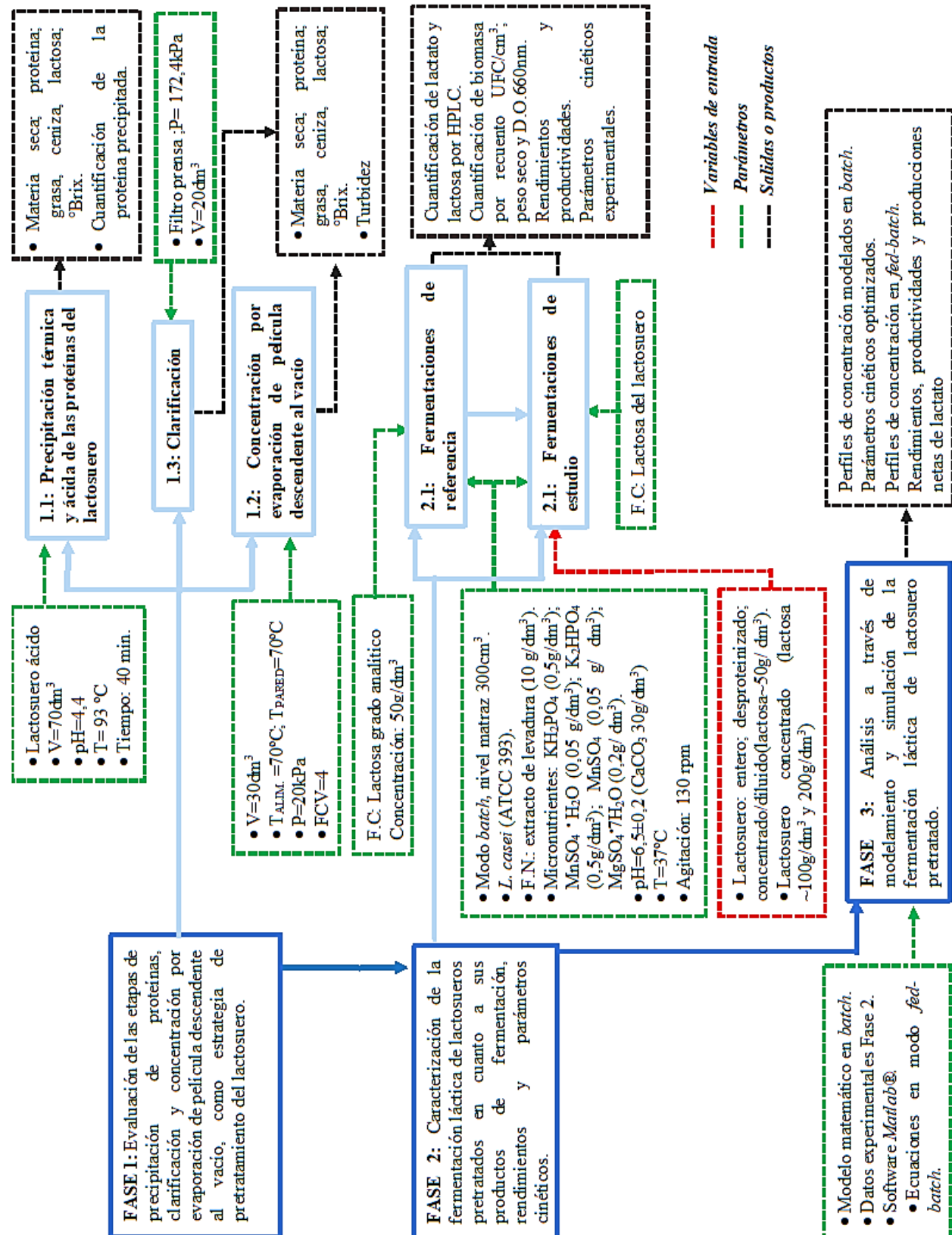


Figura 6. Cuadro metodológico, (TNE= Temperatura normal de ebullición, FN=fuente de nitrógeno, FC=fuente de carbono, FCV= Factor de Concentración Volumétrica).

Durante el proceso, se realizó el seguimiento de los °Brix, el pH y la tasa de evaporación, mientras que los concentrados fueron caracterizados en %materia seca, %proteína, %grasa, %ceniza, % lactosa, °Brix y turbidez.

2.2. Fase 2: Caracterización de la fermentación de lactosueros pretratados en cuanto a sus productos de fermentación rendimientos y parámetros cinéticos.

2.2.1. Fermentaciones con lactosueros pretratados y con el medio de referencia. En esta fase se caracterizó la fermentación de tres distintos medios de fermentación basados en: lactosuero entero (sin tratar), lactosuero desproteinizado y lactosuero concentrado/diluido, junto con un medio de referencia a partir de lactosa grado analítico, todos a una concentración inicial de lactosa (S_0) de $\sim 50 \text{ g/dm}^3$.

Activación de la cepa *L. casei* ATCC 393: La cepa liofilizada *L. casei* ATCC 393 en presentación *kwik-stick* fue activada en cajas *Petri* con agar *MRS* en condiciones de anaerobiosis (utilizando sobres de *Anaerocult Merck*) e incubada a 37°C durante 24 h. Las cepas de trabajo fueron refrigeradas a 4°C (durante máximo 20 días), mientras que la cepa de reserva se preservó a -70°C (crioviales con perlas).

Características del medio de precultivo: Para cada set de fermentaciones, se prepararon 200 cm^3 de precultivo con la siguiente composición: extracto de levadura (10 g/dm^3), KH_2PO_4 ($0,5 \text{ g/dm}^3$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ g/dm}^3$), K_2HPO_4 ($0,5 \text{ g/dm}^3$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g/dm}^3$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,05 \text{ g/dm}^3$), lactosa grado analítico (50 g/dm^3 para el medio de referencia), o 200 cm^3 de lactosuero desproteinizado para los medios basados en lactosuero. Este medio se esterilizó en autoclave a 121°C , durante 15 min, luego se ajustó el pH inicial del precultivo a 6,5 con NaOH 1N y se transfirió una asada de la cepa de trabajo, incubándose a 37°C durante 12 h sin agitación.

El precultivo fue estandarizado mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonia por centímetro cúbico (UFC/cm³) y densidad óptica (D.O.) a 660nm.

Características de los medios de fermentación: Para iniciar las fermentaciones se transfirieron 30 cm³ del precultivo en fase exponencial de crecimiento a 270 cm³ de cada ensayo, cada uno con las mismas concentraciones de nutrientes en el medio (e. de levadura, KH₂PO₄, MnSO₄·H₂O, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, lactosa o lactosuero pretratado), además de CaCO₃ a una concentración del 60% de la concentración inicial de lactosa en el medio, para mantener el pH en 6,5 ± 0,2.

La temperatura fue 37°C, la agitación 130 rpm, mientras que para los muestreos se tomaron 10 cm³ de cada medio en todas las pruebas, realizadas en condiciones asépticas, por duplicado, para cuantificar consumo de lactosa y producción de lactato por HPLC, crecimiento microbiano mediante recuento de células viables UFC/cm³, D.O._{660 nm} y peso seco. El rendimiento producto sustrato (Y_{p/s}) fue calculado mediante la Ecuación 2, la productividad volumétrica (P) con la Ecuación 3 y la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{máx.}) con la pendiente de la fase exponencial obtenida al graficar la Ecuación 4.

Ecuación 2

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Producción neta de lactato [g/L]}}{\text{Consumo de lactosa [g/L]}}$$

Ecuación 3

$$P = \frac{\text{Producción neta de lactato [g/L]}}{\text{Tiempo de producción [h]}}$$

Ecuación 4

$$\mu_{máx} = \frac{\ln(N/N_0)}{t - t_0}$$

Donde, N es la concentración de células viables (UFC/cm³) en el tiempo t y N₀ es la concentración de células viables (UFC/cm³) en t=t₀.

2.2.2. Fermentaciones con lactosueros concentrados. Se evaluaron dos medios de fermentación a partir de lactosuero concentrado así: Medio 1, concentración inicial de lactosa (S_0) de $\sim 100 \text{ g/dm}^3$ y Medio 2 $S_0 \sim 200 \text{ g/dm}^3$, por duplicado, manteniendo la concentración de extracto de levadura, KH_2PO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y, con 60 g/L CaCO_3 para el Medio 1 y 120 g/dm^3 de CaCO_3 para el Medio 2, correspondientes al 60% de S_0 , controlando el pH en $6,5 \pm 0,3$. La producción de lactato y el consumo de lactosa se cuantificó por HPLC, mientras que el seguimiento al crecimiento microbiano se realizó mediante D.O. 660 nm y peso seco. $Y_{p/s}$ y P se calcularon mediante las Ecuaciones 2 y 3 respectivamente y $\mu_{\text{máx}}$ con la Ecuación 4, pero cambiando N y N_0 por X y X_0 (peso seco en g/dm^3).

2.3. Fase 3: Análisis a través de modelamiento y simulación de la fermentación láctica de lactosueros pretratados.

En esta fase se seleccionaron las distintas ecuaciones del modelo matemático para describir de forma adecuada la fermentación láctica de lactosuero. Se trabajó con los datos experimentales obtenidos para los medios con lactosuero procesado a $S_0 \sim 50 \text{ g/dm}^3$ de lactosa y 100 g/dm^3 (Medio 1). Se realizó la optimización de los parámetros cinéticos del modelo en *batch* buscando el mejor ajuste entre los datos experimentales y los simulados. La verificación de éste se hizo mediante la comparación de los parámetros calculados con los reportados en la literatura para fermentaciones similares.

Posteriormente, con los parámetros cinéticos obtenidos en la optimización del proceso en *batch* para los dos medios mencionados anteriormente, se realizó la simulación del proceso en modo de operación *fed-batch*, simulando inicialmente un diseño factorial 3^2 variando la velocidad de dilución (D) y la concentración de la solución de alimentación ($S_{0 \text{ fed-batch}}$) a tres niveles distintos en cada medio. Las mejores condiciones para D y $S_{0 \text{ fed-batch}}$ se determinaron con

base en la mayor concentración de lactato generada y los menores niveles de lactosa residual en el medio. Con estas condiciones se obtuvieron los perfiles de concentración, se calcularon las productividades y se realizó un comparativo con lo obtenido experimentalmente en *batch*.

2.4. Materiales, métodos experimentales y de cuantificación.

2.4.1. Materiales e insumos. Pretratamiento: Lactosuero ácido proveniente de las actividades de producción de quesos hilados en el SENA C.A.S.A. Piedecuesta, Santander; ácido láctico comercial (85%v/v), solución de NaOH 1N ; pH-metro *Hanna*[®]; medio filtrante *drill super 8*; soluciones de limpieza de ácido acético e hipoclorito comercial.

Fermentaciones: *L. casei* ATCC[®]393 *kwick-stik passage 3* (*Microbiologics*), Agar *MRS* (*Merck*); extracto de levadura (*Merck*), KH_2PO_4 (*Merck*), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*Merck*), K_2HPO_4 (*Merck*), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (*Merck*), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*Panreac*), CaCO_3 (*Panreac*), solución de H_2SO_4 8 Mm, (todo grado analítico); matraces *Erlenmeyer* de 500 cm³.

2.4.2. Métodos experimentales. Pretratamiento: La desproteinización se realizó en una marmita industrial de 150 dm³ por calentamiento directo con llama, utilizada en el SENA para la coagulación del queso (Figura 7.a), la clarificación mediante filtración en el filtro prensa de la Escuela de Ingeniería Química (Figura 7.b), mientras que la concentración se hizo en el evaporador de película descendente al vacío del grupo CICTA (Figura 7.c).

Fermentaciones: Se llevaron a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 500 ml con un volumen de trabajo de 300 cm³ en una incubadora de baño termostatado y agitación orbital.

Modelamiento y simulación: La solución del sistema de ecuaciones diferenciales seleccionado y la simulación del modo de operación *fed-batch* se llevó a cabo mediante una rutina programada en el software *Matlab R2019a*, haciendo uso del solver *ODE45* acoplado al optimizador *lsqnonlin-lsqcurvefit*.

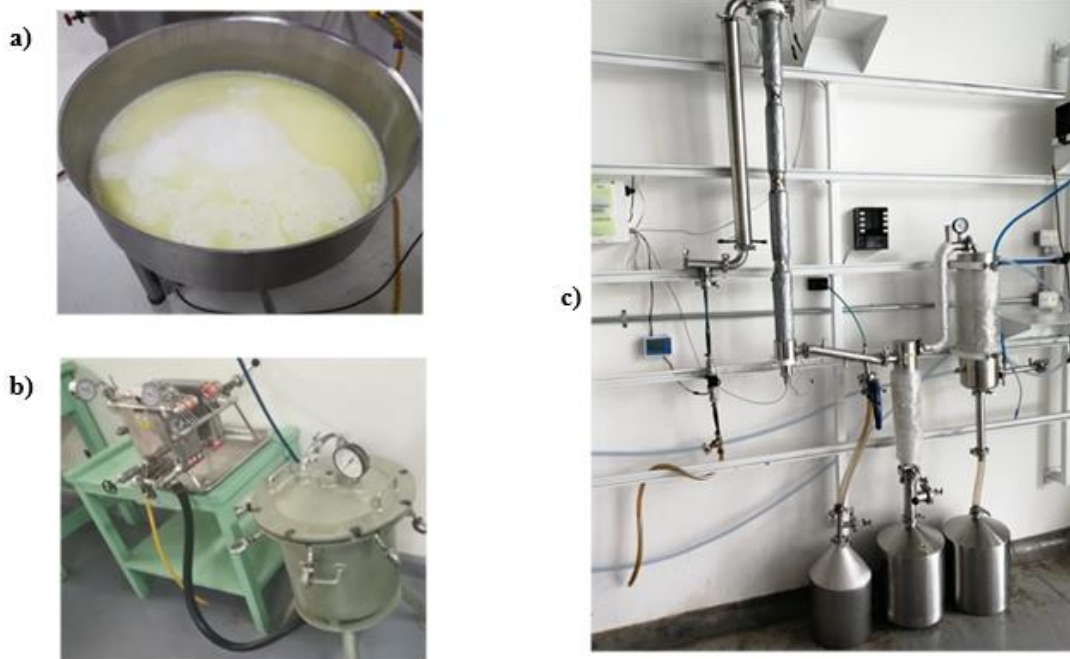


Figura 7. Equipos utilizados en el pretratamiento del lactosuero: a) marmita industrial; b) filtro prensa; c) evaporador de película descendente al vacío.

2.4.3. Métodos de cuantificación. Análisis bromatológico, °Brix y turbidez: %materia seca (A.O.A.C. 990,19); %proteína (A.O.A.C. 991,20), %grasa (A.O.A.C. 2000), °Brix con refractómetro portable *Fisher N° 13964*, turbidez con turbidímetro portable *Hanna HI93703*. Cuantificación de lactosa y lactato: Cuantificación por HPLC empleando una columna *Coregel 107*, acoplada a un equipo UFCL LC 20D (*Shimadzu*) seguida de un detector de índice de refracción RID-10A. Se operó en modo isocrático, a temperatura de 30°C, flujo de 0,6 cm³/min, durante 20 min, empleando como fase móvil H₂SO₄ 8mM.

Recuento de UFC/cm³: Se realizó mediante conteo luego de 24 h-48 h de crecimiento, de células viables en agar *MRS*, sembradas en profundidad a distintas diluciones decimales.

Medición de D.Q.: Para los medios de fermentación con S₀ ~50 g/dm³ (excepto el basado en lactosuero entero) se midió en espectrofotómetro *GENESYS 20 ThermoSpectronic®* tomando 5 cm³ de muestra y diluyendo en 5 cm³ de HCl 1N para eliminar el exceso de CaCO₃ insoluble. Para la medición de los medios con lactosuero concentrado con S₀ ~100 g/dm³ se diluyeron 5

cm³ de muestra en 8 cm³ de HCl 1N. Luego se tomó 0,15 cm³ y se aforó hasta 3 cm³ (volumen de muestra en la celda) con H₂O destilada estéril. Para los medios con S₀ ~200 g/dm³ se diluyeron 5 cm³ de muestra en 12 cm³ de HCl 1N y se transfirió la misma cantidad a la celda.

Determinación del peso seco: Se realizó mediante centrifugación de las muestras diluidas en HCl 1N, en centrífuga *Thermo scientific*® 5L40 a 5500 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue descartado, mientras que el pellet remanente en los tubos se secó a 65°C hasta peso constante.

3. Análisis y discusión de resultados

3.1. Fase 1: Evaluación de las etapas de precipitación de proteínas, clarificación y concentración por evaporación de película descendente al vacío como estrategia de pretratamiento del lactosuero.

3.1.1. Desnaturalización térmica y ácida. La desproteinización del lactosuero mediante tratamiento térmico y ácido, se realizó a un volumen de 70 dm³, tal como se muestra en la Figura 8. En la Tabla 4, se presenta la caracterización bromatológica y otros parámetros fisicoquímicos para el lactosuero antes y después de esta etapa, junto con el requesón separado.

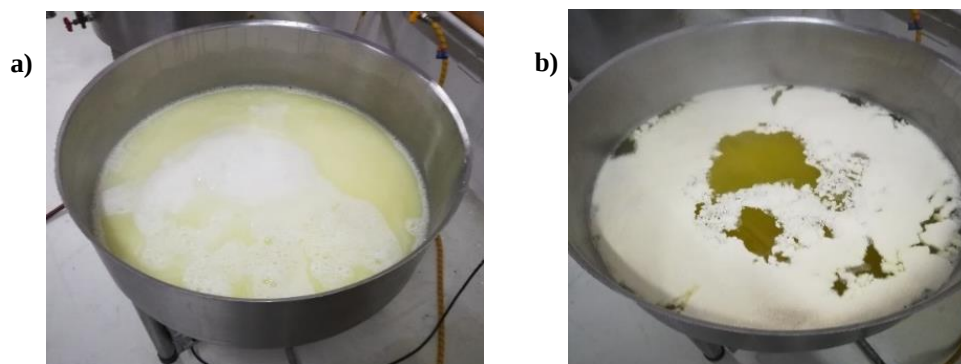


Figura 8. a) Lactosuero antes de iniciar la desproteinización y b) lactosuero finalizada la desproteinización.

Tabla 4.
Composición del lactosuero antes y después de la desproteinización y del requesón separado.

Parámetro	Lactosuero entero	Lactosuero desproteinizado	Requesón
Humedad [%p/p]	93,95±0,03	93,98±0,01	81,61±0,00
Materia seca [%p/p]	6,74±0,03	6,02±0,01	18,39±0,00
Carbohidratos [%p/p]	5,20±0,02	4,91±0,01	6,58±0,00
Lactosa [g/dm ³]	50,13±1,8	52,43±1,9	-
Proteína [%p/p]	0,79±0,01	0,53±0,01	11,23±0,01
Grasa [%p/p]	0,27±0,05	*DLD	*DLD
Ceniza [%p/p]	0,48±0,00	0,58±0,00	0,57±0,01
Ácido láctico [g/dm ³]	4,05±0,35	5,50±1,50	-
pH	5,68±0,01	4,40±0,01	-
°Brix	6,0±0,0	5,5±0,5	-
Turbidez [NTU]	2348±11	95,1±1,0	-
Densidad [g/cm ³]	1,024±0,004	1,023±0,003	-

Nota:*DLD (Debajo del límite de detección).

La composición inicial del lactosuero ácido se encuentra dentro de lo reportado por otros autores en distintos trabajos (Bylund, 2015; Cáceres & Mora, 2017). Se puede apreciar una reducción del 33,1% en el contenido de proteína del lactosuero desnaturalizado con respecto al inicial. Considerando la masa de proteína húmeda separada al terminar la desnaturalización (3,3 kg) y el volumen inicial del lactosuero tratado (70 dm³), se determinó una separación de 47,1 g proteína húmeda/dm³ lactosuero procesado, equivalente a un rendimiento del 4,7%. (Puente *et al.*, 2010) reportan la obtención de 49,2 g proteína húmeda/dm³ de lactosuero (rendimiento de 4,9%), en pruebas realizadas a las mismas condiciones de acidez, temperatura y tiempo fijadas en el presente estudio, pero a nivel matraz, mientras que Riera, González, & Muro (2016), alcanzaron un rendimiento de 5,6% trabajando entre 85°C - 90°C durante 1 h.

Por otra parte, el rendimiento reportado en cartillas de formación del Sena para preparación del requesón es del 5,3%, partiendo de lactosuero con acidez inicial de entre 37°D - 40°D (aprox. 3,7 g/dm³ y 4,0 g/dm³ de ácido láctico) y calentando a 85°C (Garcia *et al.*, 1987). Chandan

(2003), afirma de manera general, que el rendimiento promedio en la obtención de requesón, conocido también como queso *Ricotta* o queso *Cottage* está entre el 5 y 6%.

Se distinguen pequeñas diferencias entre el rendimiento experimental calculado con respecto a los rendimientos citados anteriormente. Es importante tener en cuenta que son muchos los factores que inciden en la composición de la leche (raza bovina, clima, edad del animal, etc.), además de diferentes protocolos de elaboración de una amplia diversidad de quesos, con lo cual las características del lactosuero usado para la obtención de requesón no son siempre las mismas. Adicionalmente, aspectos relacionados al procesamiento como el mecanismo de transferencia de calor al lactosuero y el sistema de drenaje y recuperación de la proteína separada, ejercen influencia sobre la cantidad de requesón obtenida. En este estudio, por ejemplo, el calor se transfirió de forma directa (por medio de llama) a la parte inferior de la marmita, mientras que la separación del lactosuero de la capa de proteína desnaturalizada (ubicada en la superficie) se realizó por medio de drenado con manguera. Con base en lo anterior, la eficiencia de esta etapa podría mejorarse mediante un sistema de calentamiento por chaqueta de vapor, que suministre energía de manera global a todo el líquido, en un tanque tipo decantador provisto de una válvula de descargue, para una mejor distribución del calor y facilidad de drenado, respectivamente.

Al finalizar esta etapa, se logró separar una cantidad importante de proteína, con rendimientos similares a lo reportado en la literatura y en los procesos tradicionales de elaboración de requesón. Vale la pena destacar que la desproteinización es muy importante en el esquema de procesamiento del lactosuero, ya que en primer lugar facilita las posteriores etapas de producción, al reducir de manera importante el ensuciamiento de los equipos (generado por la precipitación de las proteínas), y lo más importante, permite obtener un subproducto de alto valor nutricional (rico en aminoácidos), que puede ser aprovechado en esta misma línea productiva

mediante hidrólisis, para su uso como fuente de nitrógeno en el metabolismo de bacterias ácido lácticas.

Con respecto a lo anterior, se codirigió un trabajo de pregrado (Duarte, 2018), en el cual se evaluó la utilización de hidrolizados de requesón como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica de la lactosa, obteniendo resultados comparables al desempeño del extracto de levadura bajo las condiciones evaluadas, lo cual tendría una incidencia positiva en la reducción de los costos de producción de lactato utilizando como sustrato lactosuero.

3.1.2. Clarificación en filtro prensa. El lactosuero resultante de la etapa anterior, en la cual se retiró la mayor parte de carga proteica, fue posteriormente filtrado mediante filtro prensa con el fin de separar el material insoluble residual, en modo de operación *batch* alimentando un volumen de 20 dm³ por ciclo. En la Figura 9, se muestra la curva de evolución de la filtración de lactosuero desproteinizado y la estimación de las resistencias para el primer ciclo de filtración, con el medio filtrante limpio, y el segundo ciclo, con el medio filtrante con la torta generada luego de la primera pasada.

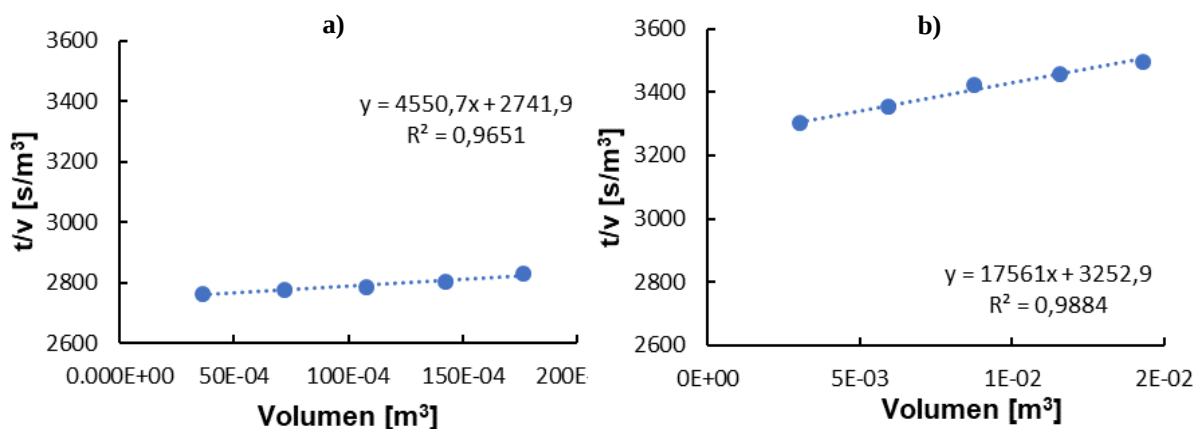


Figura 9. Curvas de filtración de lactosuero desproteinizado A. de filtración= 0,0039 m²; V=20 dm³; T ambiente; P=137,9 kPa, a)primer ciclo, b) segundo ciclo.

La correlación de los datos experimentales junto con la Ec. 5 (McCabe, 2007), permitió la estimación tanto de la resistencia de la torta como del medio filtrante.

Ecuación 5

$$\frac{dt}{dV} = \frac{\alpha \mu c}{A^2 \Delta P} V + \frac{R_m \mu}{A \Delta P}$$

En la Tabla 5, se muestran las propiedades físicas utilizadas junto con el cálculo de las resistencias.

Tabla 5.
Estimación de las resistencias a la filtración de lactosuero desproteinizado.

Propiedades físicas	Primer ciclo	Segundo ciclo
Viscosidad μ [Pa.s]	1×10^{-3}	1×10^{-3}
Concentración c [kg/m ³]	5,4434	4,7859
Área de filtración A [m ²]	0,0039	0,0039
Caída de presión promedio ΔP [Pa]	11031,6	5929,5
Resistencia de la torta α [m/kg]	$1,40 \times 10^5$	$3,31 \times 10^5$
Resistencia del medio filtrante R_m [m⁻¹]	$1,18 \times 10^8$	$7,52 \times 10^7$

La filtración del lactosuero desproteinizado fue rápida, de modo que en ambos casos 20 dm³ de lactosuero fueron filtrados en 1 min, debido al bajo contenido inicial de proteína insolubilizada <0,53%p/p y <0,47%p/p en el primer y segundo ciclo, respectivamente. La resistencia de la torta en el segundo ciclo fue 3,3 veces mayor con respecto al primero, al verse afectada por alguna formación de capa filtrante y la reducción en su porosidad.

En los dos casos analizados, la resistencia por parte del medio filtrante fue mayor que la ejercida por la torta (aproximadamente en 3 órdenes de magnitud), lo cual sugiere que el proceso

estuvo dominado por la resistencia del medio filtrante. No obstante, con un valor aproximadamente entre 2 y 3 órdenes de magnitud menor a los valores típicos de resistencia reportados en la literatura para lonas, los cuales están entre 10^{10} m^{-1} y 10^{11} m^{-1} (McCabe, 2007). La cercanía de los valores calculados para R_m , harían pensar que la resistencia del medio filtrante tipo *drill* estaría en un valor cercano a $1 \cdot 10^8 \text{ m}^{-1}$.

En una prueba preliminar realizada alimentando al filtro prensa 20 dm^3 de lactosuero con la carga completa (conteniendo la proteína desnaturalizada), únicamente pudieron filtrarse 10 dm^3 en 6,4 min por colmatación total del medio filtrante. La Figura 10 muestra la comparación visual de las tortas obtenidas en cada caso.

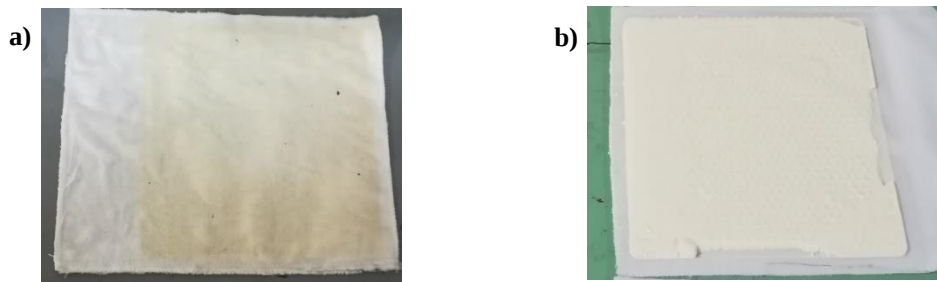


Figura 10. Torta de filtración obtenida para lactosuero con a) carga de proteína retirada en la etapa de desnaturalización y b) carga de proteína completa. ($A_{\text{FILTRACIÓN}}=0,0039 \text{ m}^2$; $V=20 \text{ dm}^3$; T ambiente; $P= 137,9 \text{ kPa}$).

Desde el punto de vista operacional, se considera adecuado retirar la mayor carga de proteína desnaturalizada, como paso previo a la filtración del lactosuero en el filtro prensa como se indicó en la sección anterior, como alternativa conveniente para procesar mayores volúmenes de lactosuero y lograr la separación de cualquier material insoluble remanente en la solución. La Tabla 6, muestra la caracterización bromatológica y la turbidez para el lactosuero al inicio y al final del ciclo de filtración.

Se presenta cierta disminución en el %materia seca, asociado primordialmente a una reducción del 15% en el %proteína luego de la filtración, similar a la obtenida por Cáceres & Mora (2017), quienes alcanzaron una reducción del 17,8% en el contenido de proteína, en

filtraciones de lactosuero en modo *batch* utilizando membranas cerámicas de 0,22 μm . En cuanto a la turbidez se registró un descenso del 14% con turbidez final de $81,8 \pm 0,3$ NTU, mientras que Cáceres & Mora (2017), reportan una turbidez final del clarificado de $8,9 \pm 3,4$ NTU.

Tabla 6.

Caracterización del lactosuero al inicio y al final de cada ciclo por el filtro prensa.

Propiedad	Inicial	Final ciclo 1	Final ciclo 2	Cáceres & Mora, 2017
Materia seca [%p/p]	6,02 $\pm$ 0,01	5,60 $\pm$ 0,00	5,61 $\pm$ 0,01	6,16 $\pm$ 0,19
Carbohidratos [%p/p]	4,91 $\pm$ 0,01	4,57 $\pm$ 0,01	4,59 $\pm$ 0,02	5,32 $\pm$ 0,08
Proteína [%p/p]	0,53 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,00	0,45 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,04
Ceniza [%p/p]	0,58 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02
Grasa [%p/p]	*DLD	*DLD	*DLD	*DLD
Turbidez [NTU]	95,2 $\pm$ 1,0	83,3 $\pm$ 1,5	81,8 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 3,4

Se presenta cierta disminución en el %materia seca, asociado primordialmente a una reducción del 15% en el %proteína luego de la filtración, similar a la obtenida por Cáceres & Mora (2017), quienes alcanzaron una reducción del 17,8% en el contenido de proteína, en filtraciones de lactosuero en modo *batch* utilizando membranas cerámicas de 0,22 μm . En cuanto a la turbidez se registró un descenso del 14% con turbidez final de $81,8 \pm 0,3$ NTU, mientras que Cáceres & Mora (2017), reportan una turbidez final del clarificado de $8,9 \pm 3,4$ NTU.

3.1.3. Concentración por evaporación de película descendente al vacío. Se realizaron pruebas de concentración de lactosuero desproteinizado clarificado, con volúmenes iniciales de 33,6 dm³ y 25 dm³ respectivamente, buscando alcanzar un FCV de 4, bajo las condiciones de operación descritas en la metodología. En la Figura 11, se muestra la evolución de los °Brix y del FCV en función del tiempo de operación del equipo.

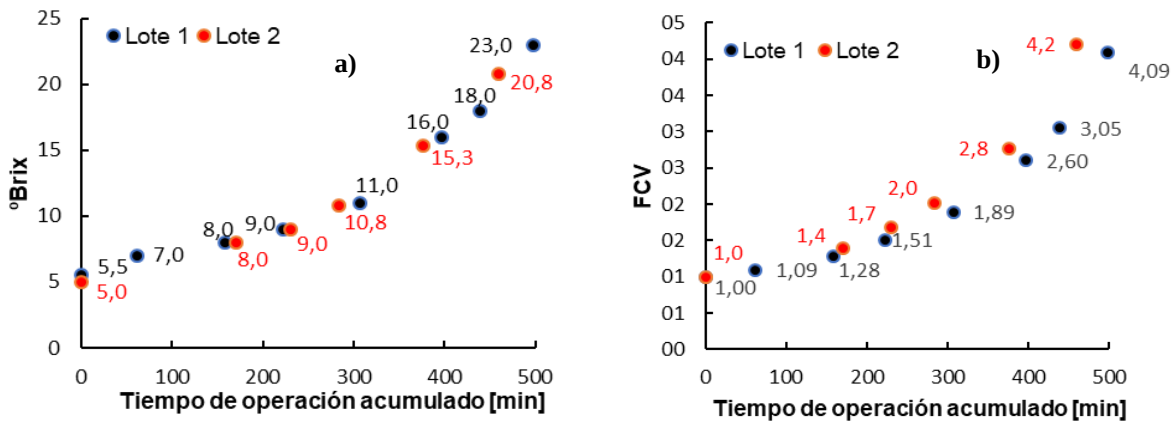


Figura 11. Evolución de los °Brix (a) y el FCV (b) en función del tiempo de operación en la concentración de lactosuero desproteinizado/clarificado por evaporación de película descendente al vacío ($T_{\text{ALIMENTACIÓN}} 70^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{PARED}} 70^{\circ}\text{C}$ y P de 200 kPa).

Puede observarse, que tanto los °Brix como el FCV siguen la misma tendencia de crecimiento, distinguiéndose en ambos casos que luego de alcanzarse el FCV de 2 , su incremento fue más rápido como era de esperarse, debido a que el volumen de agua a retirar era mucho menor para alcanzar el factor deseado, además de que la tasa de evaporación se mantuvo aproximadamente constante en $2,3 \text{ dm}^3/\text{h}$.

La concentración de sólidos solubles alcanzada en cada factor fue similar a la obtenida en un estudio previo por Cáceres & Mora (2017), utilizando el mismo piloto de evaporación. Cabe resaltar que ajustes realizados al equipo por Correa & Monroy (2019) mejoraron la operatividad del evaporador al favorecer la formación de la película en el tubo evaporador, realizando un menor número de ciclos de evaporación, con mayor duración en cada uno de ellos; todo esto permitió reducir el tiempo de operación.

La Tabla 7 muestra la caracterización realizada a los concentrados de los dos lotes procesados a diferentes FCV. En ella se observa en primer lugar, la buena reproducibilidad alcanzada en la operación con los dos lotes procesados, con ciertas diferencias en la turbidez, la cual es una

medición muy sensible incluso a pequeños cambios, mientras la densidad de los concentrados a un FCV~ 4, tuvo un aumento de cerca del 8% con respecto al lactosuero sin concentrar.

Tabla 7.
Caracterización de los concentrados de lactosuero obtenidos.

Propiedad	Lote	FCV 1,0 FCV 1,0*	FCV 1,9 FCV 2,0*	FCV 3,1 FCV 2,8*	FCV 4,1 FCV 4,2*
Humedad	1	93,32±0,06	88,53±0,05	81,89±0,01	76,32±0,11
[%p/p]	2	93,87±0,00	88,20±0,01	84,00±0,03	78,29±0,02
Materia seca	1	5,68±0,06	11,47±0,05	18,11±0,01	23,68±0,11
[%p/p]	2	6,13±0,00	11,80±0,01	16,00±0,03	21,71±0,02
Carbohidratos	1	4,56±0,03	9,51±0,02	14,94±0,02	19,65±0,06
[%p/p]	2	5,01± 0,01	9,66±0,02	12,99±0,03	17,71±0,02
Proteína	1	0,49±0,01	0,82±0,02	1,34±0,05	1,68±0,04
[%p/p]	2	0,45±0,03	0,83±0,04	1,21±0,06	1,58±0,02
Cenizas	1	0,63±0,03	1,14±0,00	1,83±0,00	2,35±0,03
[%p/p]	2	0,67±0,01	1,31±0,01	1,80±0,00	2,42±0,02
Grasa	1	DLD	DLD	DLD	DLD
[%p/p]	2	DLD	DLD	DLD	DLD
Densidad	1	1,0237	1,0396	1,0653	1,1013
[g/cm³]	2	1,0089	1,0380	1,0558	1,0814
Turbidez [NTU]	1	322,7±0,8	952,0±0,0	2225,3±1,9	3896±8,6
	2	910,7±1,9	2038,7±5,0	3016,0±5,7	4686,7±6,2

Nota:*FCV para el lote 2. DLD (Debajo del límite de Detección)

En la Figura 12 se muestra el cambio en la materia seca, los carbohidratos, la proteína y las cenizas para el Lote 1. Los % de humedad, materia seca, carbohidratos, proteína y cenizas varían linealmente con el FCV (disminución en el primer caso y aumento en las demás propiedades). Se consiguieron concentrados con un contenido de sólidos totales entre 4,1 y 3,5 veces mayor al inicial para los dos lotes procesados, con composiciones muy similares a las reportadas por Tanguy *et al.* (2016) para concentrados de microfiltrados de leche, quienes para un FCV de 4,1 reportaron un 22,4%p/p de materia seca, 2,5%p/p de proteína, y 2,0%p/p de cenizas (asociadas a minerales como Ca, Mg, P, K y trazas de Fe, Zn y Cu), encontrando un incremento lineal en los sólidos con el FCV. Sus condiciones de operación fueron P de 20 kPa, T_{ALIMENTACIÓN} 65°C y T_{EVAPORACIÓN} 60°C en un evaporador de 3 tubos en serie de 4 m de longitud cada uno.

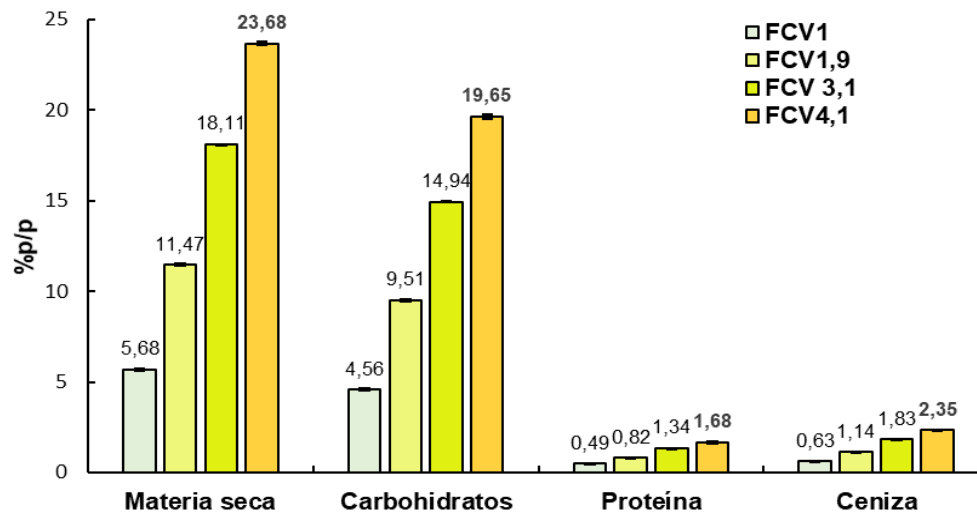


Figura 12. Caracterización bromatológica de los concentrados del Lote 1 de lactosuero.

La Figura 13 muestra diferencias en el aspecto visual de los concentrados obtenidos para los diferentes FCV. En cada muestra se aprecia que el color amarillo se fue intensificando a medida que el lactosuero se fue concentrando, lo cual se atribuye al aumento progresivo en la concentración de la riboflavina (Tanguy *et al.*, 2016).



Figura 13. Concentrados de lactosuero a diferentes FCV.

Las mediciones de turbidez presentadas en la Figura 14, dan soporte al cambio de color mencionado anteriormente. Se aprecia un aumento lineal en función del FCV, con valores más altos para el lote 2 de lactosuero. Cáceres & Mora (2017), reportaron un comportamiento similar para sus concentrados, con valores más bajos que en el presente estudio, 16 NTU y 932 NTU para FCV1 y FCV4, respectivamente. Sin embargo, en su estudio la etapa de concentración se

realizó con lactosueros microfiltrados (con menor %proteína), lo cual permitió tener concentrados con una turbidez más baja.

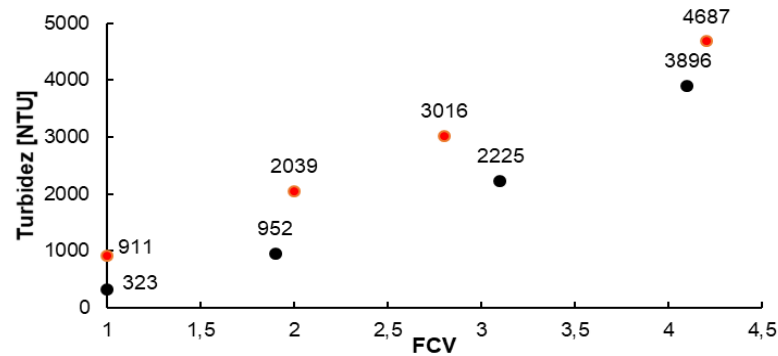


Figura 14. Turbidez de los concentrados de lactosuero obtenidos.

3.2 Fase 2: Caracterización de la fermentación de lactosueros pretratados en cuanto a sus productos de fermentación, rendimientos y parámetros cinéticos.

3.2.1 Caracterización inicial del desempeño de *L. casei* ATCC 393 en fermentaciones lácticas. Inicialmente, se realizó la activación de la cepa comercial liofilizada, para ello se hizo su siembra en condiciones de anaerobiosis (utilizando sobres de *Anaerocult*®) en placas *Petri* con agar *MRS* e incubadas a 37°C durante 48 h. Con la cepa activada, se procedió a estandarizar su crecimiento en el medio de precultivo (lactosuero desproteinizado) con la composición mencionada en la Metodología, en términos de Unidades Formadoras de Colonia por centímetro cúbico (UFC/cm³) y densidad óptica (D.O.) a 660nm. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8.

Estandarización del tamaño del inóculo en el medio de precultivo mediante medición de D.O.660nm y recuento de UFC/cm³.

Tiempo [h]	D.O. (660nm)	Recuento [UFC/cm ³]
0	0,001	6,0x10 ⁷
4	0,224	1,1x10 ⁸
8	0,757	4,0x10 ⁸
12	0,872	4,0x10 ⁹

Con los datos anteriores y usando la herramienta *curve fitting* (Matlab R2019b®) se encontró una correlación (Ecuación 6) entre las UFC/cm³ (N) y la D.O._{660 nm} en el precultivo, que permitió, mediante la medición de su D.O., asegurar una población inicial entre 1x10⁶ y 1x10⁸ UFC/cm³, garantizando así que los microorganismos fueran añadidos al medio de fermentación en su fase exponencial de crecimiento (Ríos, 2011).

Ecuación 6

$$\log_{10}(N) = 7,7820 * \exp(0,1324 * D.O.)$$

En la Figura 15 se muestra el consumo de sustrato, la producción de ácido láctico y la concentración de biomasa, en una primera prueba exploratoria, sin control de pH, en un medio de fermentación a partir de lactosa grado analítico, además del seguimiento del pH y la medición de la D.O._{660 nm}. Se aprecia en primer lugar, que sólo el 24,1% de la lactosa disponible en el medio se consumió después de 48 h de fermentación, además, de una baja producción de ácido láctico (8,4 g/dm³).

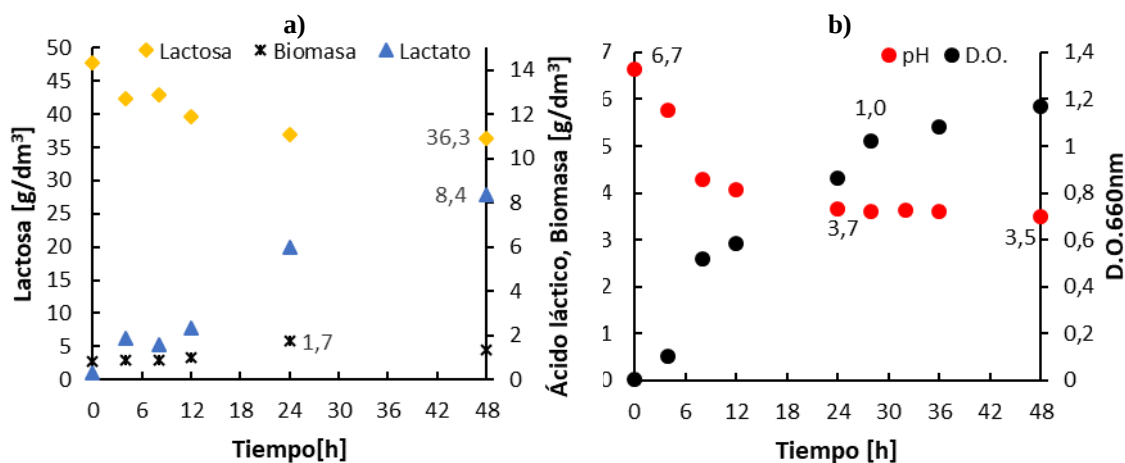


Figura 15. a) Concentraciones de lactosa, ácido láctico y biomasa; b) evolución del pH y D.O._{660nm} en fermentación de lactosa comercial con *L. casei* ATCC 393 a 37°C, 130rpm, sin control de pH.

La fase exponencial de crecimiento microbiano, vista desde la concentración celular másica y la D.O., se dio entre las 24 h y 28 h con una concentración máxima de 1,7 g/dm³ y una D.O.

máxima de 1,2. En las primeras 24 h de fermentación se registró un descenso importante en el pH hasta un valor de 3,7; a partir de este tiempo se detuvo el consumo de lactosa, mientras que la concentración de ácido láctico pasó de 6,0 g/dm³ a 8,4 g/dm³ entre las 24 h y las 48 h. Este aspecto muestra una formación de producto mixta asociada al crecimiento, comportamiento típico de las fermentaciones lácticas (Shuler & Kargi, 2000). En la Tabla 9 se resumen los rendimientos, la productividad, el consumo de lactosa y producción de ácido láctico.

Tabla 9.

Resumen parámetros de fermentación sin control de pH con L. casei ATCC 393 a 37°C, 130 rpm y pH inicial de 6,5.

Parámetro	Producción neta á. láctico	Consumo de lactosa	Y _{P/S}	Y _{X/S}	Productividad
Valor	8,4 g/dm ³	11,5 g/dm ³	0,73 g/g	0,078 g/g	0,18 g/dm ³ .h

Lo anterior confirma como la fermentación láctica con bacterias del género *Lactobacillus* está fuertemente influenciada por el pH. Tal como se menciona en la literatura, un pH inferior a 5 inhibe fuertemente los procesos metabólicos propios de este tipo de microorganismo (Miller *et al.*, 2017).

3.2.2 Fermentaciones con lactosueros pretratados con control de pH. Crecimiento microbiano: Se realizó seguimiento al crecimiento microbiano durante las fermentaciones con control de pH realizadas con los 4 medios de fermentación: lactosa grado analítico (medio de referencia), lactosiero entero (l. entero), lactosiero desproteinizado (l. desproteinizado) y lactosiero concentrado, (l. concentrado), mediante la cuantificación de las UFC/cm³, la D.O._{660nm} y la determinación de la concentración másica celular (X) por medio de la estimación del peso seco [g/dm³]. Al medio l. entero se le hizo únicamente recuento de UFC/cm³, debido a que la proteína insolubilizada luego de la esterilización interfería en la medición de D.O. y peso seco.

La Figura 16 muestra la cinética de crecimiento microbiano en las 48 h de fermentación junto con el pH promedio durante cada prueba. La cuantificación de las UFC/cm³ y del peso seco X evidencian un periodo de adaptación del microorganismo <6h en todos los medios de fermentación evaluados, los cuales, a diferencia del utilizado para el precultivo, contenían CaCO₃ para el control del pH.

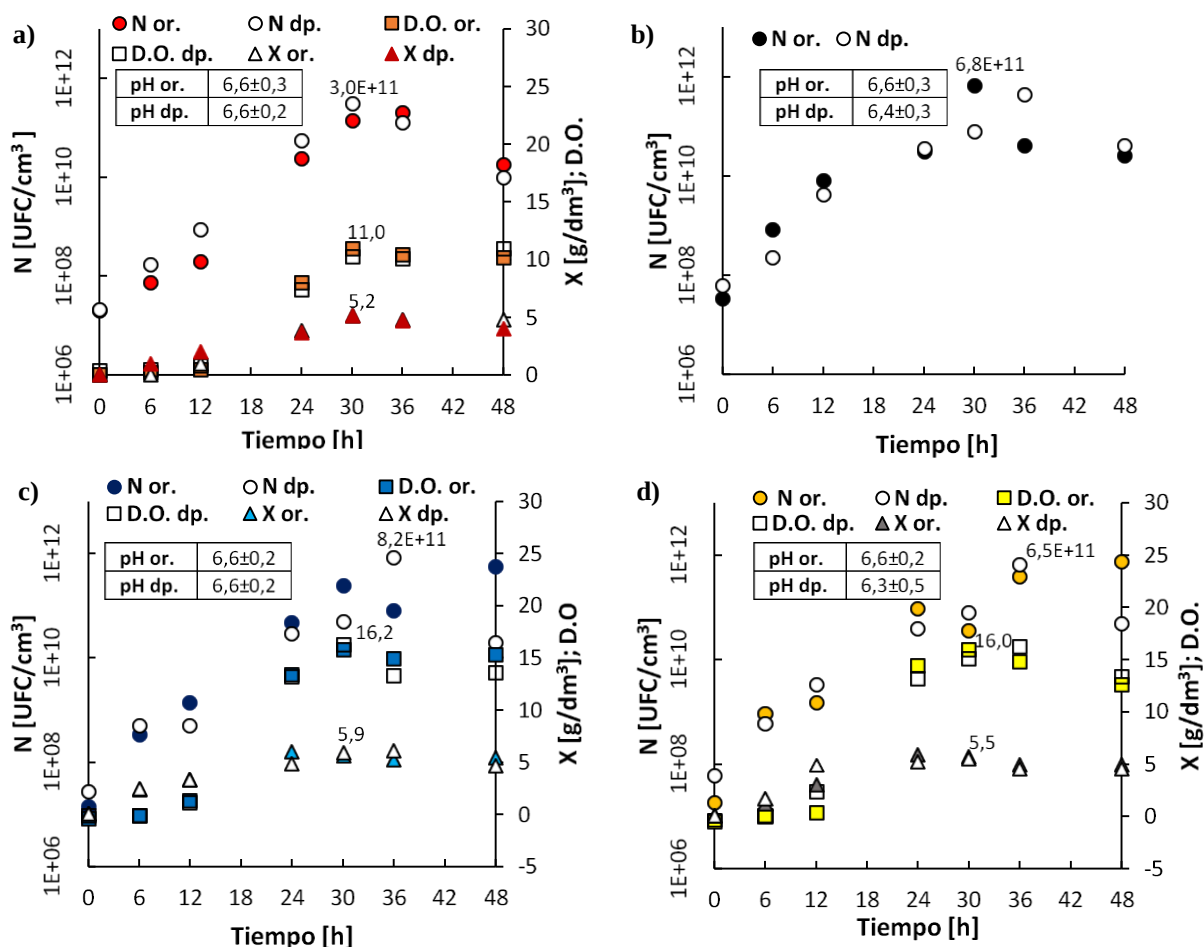


Figura 16. Cinéticas de crecimiento microbiano de *L. casei* ATCC 393 en fermentaciones a 37°C, 130 rpm, con control de pH, en concentración celular N (UFC/cm³), peso seco X [g/dm³] y D.O._{660nm}, en los medios de fermentación: a) de referencia, b) l. entero*, c) l. desproteínizado y d) l. concentrado**. *Únicamente medición de UFC/cm³, **lactosuero concentrado, diluido 4 veces. or. y dp. (original y duplicado respectivamente).

En la Tabla 10 se presenta la duración de cada una de las fases de crecimiento (de acuerdo con las UFC/cm³) para todos los casos, mientras que en la Tabla 11 se muestran los valores más altos

alcanzados (considerando las dos series de pruebas) para UFC/cm³, D.O. y peso seco junto con la $\mu_{\text{máx}}$ y τ_d (tiempos de duplicación) calculados en todas las fermentaciones.

Tabla 10.

Duración de las fases de crecimiento de L. casei ATCC 393 en las fermentaciones a 37°C, 130 rpm, con control de pH, en los distintos medios de fermentación evaluados.

Fase de crecimiento	Medio de referencia		Medio l. entero		Medio l. desproteinizado		Medio l. concentrado	
	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>
Fase de latencia	<6h	<6h	<6h	<6h	<6h	<6h	<6h	<6h
Fase exponencial	<6-30h	<6-30h	<6-30h	<6-36h	<6-30h	<6h-36h	<6-36h	<6-36h
Fase estacionaria	24-36h	<6h	<6h	<12h	<6h	<12h	36-48h	<12h
Fase de muerte	36-48h	30-48h	30-48h	36-48h	NR	36-48h	NR	36-48h

Nota: NR: no registra. or. y dp. (original y duplicado respectivamente).

Tabla 11.

Crecimiento máximo alcanzado en términos de UFC/cm³, D.O._{660nm} y peso seco; velocidades específicas de crecimiento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) y tiempos de duplicación (T_D) en fermentaciones con L. casei ATCC 393 a 37°C, 130 rpm, con control de pH.

Medio de fermentación	UFC/cm ³ máx.	D.O. máx	X máx. [g/dm ³]	Velocidad esp. de crecimiento*			
				$\mu_{\text{máx or.}}$ [h ⁻¹]	T_D [h ⁻¹]	$\mu_{\text{máx dp.}}$ [h ⁻¹]	T_D [h ⁻¹]
De referencia	3,00*10 ¹¹	11,00	5,18	0,31	2,24	0,32	2,17
L. entero	6,80*10 ¹¹	ND	ND	0,29	2,39	0,24	2,89
L. desproteinizado	8,20*10 ¹¹	16,23	6,08	0,31	2,24	0,26	2,67
L. concentrado	6,50*10 ¹¹	16,22	5,52	0,25	2,77	0,24	2,89

Nota: ND: no disponible. or. y dp. (original y duplicado). *Calculado con base en ln(N/No) vs t).

La fase de crecimiento exponencial tuvo una duración neta de entre 30 h y 36 h considerando las pruebas realizadas por duplicado con todos los medios, mientras que las otras mediciones relacionadas al crecimiento, D.O. y peso seco, muestran en todos los casos el cese de esta etapa a las 30 h. El recuento de células viables alcanzó un máximo de 10¹¹ UFC/cm³ en todos los ensayos realizados, valor superior en 2 órdenes de magnitud a lo obtenido por Duarte (2018) (10⁹ UFC/dm³) en fermentaciones a partir de lactosa comercial, además, la máxima D.O. fue 3,33 veces superior a la registrada en su trabajo hecho a las mismas condiciones del presente estudio,

pero sin control de pH. Adicionalmente, García *et al.* (2013), reporta un crecimiento inferior en 5 órdenes de magnitud con la misma cepa y sin control de pH (10^6 UFC/cm³), mostrando cómo el mantener un pH controlado prolonga el periodo de crecimiento celular generándose así una concentración microbiana final más alta.

Por otra parte, en trabajos realizados con cepas de la misma especie, composición similar del medio, lactosero desproteinizado como fuente de carbono y CaCO₃ como control de pH, se reporta lo siguiente: Ríos (2011), obtuvo un recuento máximo de 10^9 UFC/cm³, y un peso seco de 1,75 g/dm³, con *L. casei* ATCC 334; este menor crecimiento comparado con el presente estudio, pudo estar relacionado con el control de pH ejercido, ya que sólo se emplearon 6 g/dm³ de CaCO₃, correspondientes a un 12% de la cantidad inicial de lactosa. Cabe resaltar que, asumiendo una conversión completa de lactosa a ácido láctico, la estequiometría muestra que se requiere de un 55,6% de CaCO₃ para neutralizar el ácido generado. Altıok, Tokatli & Harsa (2006) alcanzaron una concentración celular másica un poco mayor (6,8 g/dm³) con *L. casei* NRRL B-441, en 14 h de fermentación, usando 30 g/dm³ de CaCO₃ (tal como se hizo en este trabajo).

Si se considera el valor promedio de las $\mu_{\text{máx.}}$ en las dos series de fermentaciones realizadas se obtiene $0,32 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, $0,27 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$; $0,29 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$; $0,25 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, para los medios: de referencia, l. entero, l. desproteinizado y l. concentrado, respectivamente. Para el grupo de los medios a partir de lactoseros no pueden considerarse diferencias apreciables en cuanto a $\mu_{\text{máx.}}$, considerando las desviaciones, mientras que si compara con el medio de referencia la mayor diferencia en $\mu_{\text{máx}}$ es de $0,07 \text{ h}^{-1}$ que corresponde a un τ_d de 0,60 h más alto para los medios con lactosero.

En la Tabla 12 se muestran los parámetros de crecimiento analizados anteriormente, en fermentaciones reportadas en la literatura empleando lactosuero y azúcares de grado comercial como lactosa y glucosa. De manera general, el crecimiento microbiano presenta un comportamiento acorde a lo reportado en la literatura, para condiciones de fermentación similares. El crecimiento utilizando fuentes de carbono simples (glucosa y lactosa comercial) muestra un crecimiento más rápido debido a que son medios con componentes de más fácil asimilación, mientras que en medios complejos como el lactosuero la concentración microbiana final tiende a ser mayor debido a que en el tiempo se da un aprovechamiento de otros nutrientes que están disponibles en éstos.

Tabla 12.

Parámetros de crecimiento obtenidos en estudios empleando cepas del género Lactobacillus, lactosuero y azúcares comerciales como sustrato.

Microorganismo	Sustrato	S ₀ [g/dm ³]	μ _{máx} [h ⁻¹]	Recuento máx. [UFC/cm ³]	X máx. [g/ dm ³]	Estudio
<i>L.casei</i> ATCC 393	Lactosuero entero	46 (lactosa)	0,01	5,3*10 ⁷	-	*Regino <i>et al.</i> (2014)
	Lactosuero desproteinizado	43 (lactosa)	0,02	1,8*10 ⁸	-	
<i>L. casei</i> ATCC 334	Lactosuero desproteinizado	50 (lactosa)	0,03	1,0*10 ⁹	1,5	Ríos (2011)
<i>L. casei</i> NRRL-B441	Lactosuero en polvo desproteinizado	48,1 (lactosa)	0,27	-	6,8	Altio, Tokatli & Harsa (2006))
<i>L.casei</i> KH1	Glucosa comercial	40 (glucosa)	0,63	-	6,9	Ha <i>et al.</i> (2003)
<i>L. lactis</i> Z133	Lactosa comercial	42,5 (lactosa)	1,10	-	4,8	Boonmee <i>et al.</i> (2003)
<i>L. helveticus</i>	Lactosuero en polvo desproteinizado	48 (lactosa)	0,49	-	6,5	Amrane (2001)

Nota: *Estudio sin control de pH. or. y dp. (original y duplicado respectivamente).

Consumo de lactosa y producción de lactato: La Figura 17 muestra el consumo de lactosa y la producción de lactato para las fermentaciones realizadas con los distintos sustratos evaluados.

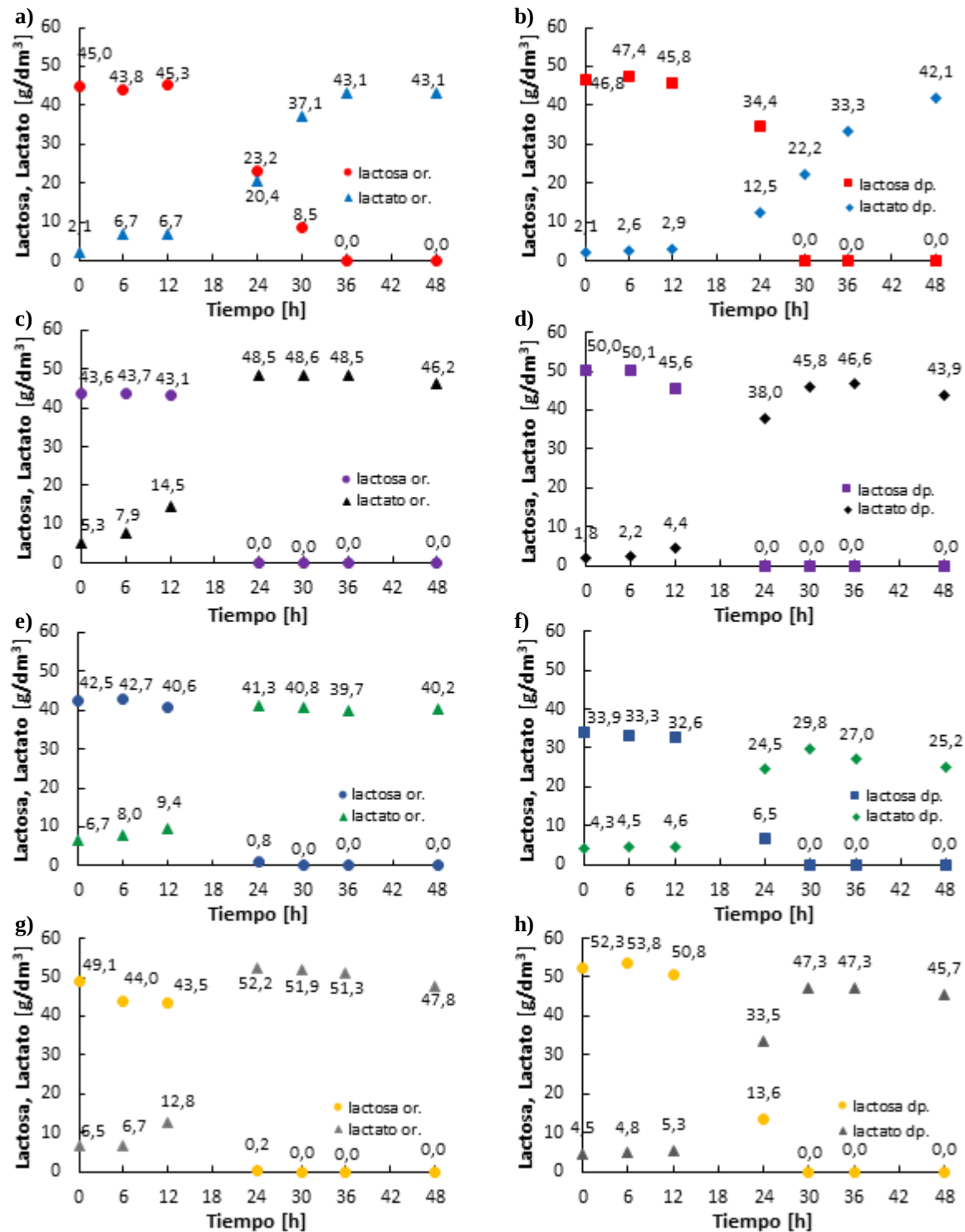


Figura 17. Consumo de lactosa y producción de lactato en las fermentaciones por duplicado con *L. casei* ATCC 393 a 37°C, 130 rpm y pH controlado con los sustratos: **a)** y **e)** medio de referencia; **b)** y **f)** lactosuero entero; **c)** y **g)** lactosuero desproteínizado; **d)** y **h)** lactosuero concentrado (diluido). Or. y dp. (original y duplicado respectivamente).

En esta figura se aprecia el consumo total de la lactosa presente, tanto en el medio de referencia como en los basados en lactosueros pretratados. Este hecho se vio favorecido por el control de pH , que evitó la inhibición del microorganismo, igualmente muestra que a este nivel de concentración ninguno de los demás componentes presentes en éstos tuvo un efecto inhibitorio.

Particularmente, hubo un consumo más rápido de la lactosa presente en el lactosero (entre 24 h y 30 h), comparado con el medio sintético (entre 30 h y 36 h), aspecto también mencionado por Altioik *et al.* (2006). En la Tabla 13 se resumen algunos parámetros de producción del metabolito de interés y el consumo de sustrato.

Tabla 13.

Parámetros de consumo de lactosa y producción de lactato en fermentaciones con L. casei ATCC 393 a 37°C, 130 rpm y pH controlado.

Sustrato	Yp/s [g/g]		Productividad [g/dm ³ .h]		Producción neta de lactato [g/dm ³]	
	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>	<u>Or.</u>	<u>Dp.</u>
Lactosa comercial	0,91	0,85	1,1	0,8	41,0	40,0
Lactosero entero	0,94	0,90	1,7	1,5	40,8	44,8
Lactosero desproteinizado	0,79	0,75	1,4	1,1	33,4	25,4
Lactosero concentrado	0,93	0,81	1,9	1,4	45,7	42,2

Nota: or. y dp. (original y duplicado respectivamente).

Los rendimientos producto/sustrato obtenidos muestran en general, una alta selectividad hacia la formación de producto y son acordes a lo obtenido en fermentaciones de permeados de lactosero en polvo. Büyükkileci & Harsa (2004), reportan un Yp/s de 0,93 g/g y una productividad de 1,87 g/dm³.h, con *L. casei* NRRL B-441 y las mismas condiciones del medio, mientras que Amrane (2001), obtuvo un Yp/s de 0,89 g/g y una productividad más alta, 5,33 g/dm³.h, pero en un biorreactor equipado y con el doble de la concentración de extracto de levadura, lo cual aceleró el crecimiento microbiano y con ello la producción de lactato.

Al haberse consumido la totalidad de la lactosa, puede apreciarse cuáles medios destinaron más energía para la producción de metabolitos y cuáles destinaron una fracción mayor para la generación de biomasa y mantenimiento celular. Las fermentaciones a partir de lactosuero desproteinizado presentaron los menores valores para $Y_{p/s}$, sin embargo, fueron los medios donde se dio mayor crecimiento microbiano y por ende en los cuales hubo un mayor gasto de energía para tal fin, mientras que los demás medios de fermentación alcanzaron rendimientos similares entre sí.

3.2.3. Fermentaciones con lactosuero concentrado. Crecimiento microbiano: Se realizaron fermentaciones utilizando lactosuero concentrado a concentraciones iniciales de lactosa (S_0) cercanas a 100 g/dm^3 (medio 1) y 200 g/dm^3 (medio 2) para el original y el duplicado, tal como se propuso en la metodología. En la Tabla 14 se muestran los °Brix del lactosuero empleado junto con la concentración inicial de lactosa de cada medio de fermentación y en la Figura 18 se muestran las cinéticas de crecimiento microbiano en cada uno de los medios evaluados.

Tabla 14.
Concentración de sólidos solubles del lactosuero empleado (°Brix) y concentración inicial de lactosa (S_0) en los medios de fermentación.

Medio		°Brix	$S_0 \text{ [g/dm}^3\text{]}$
Medio 1	Or.	10,9	95,7
	Dp.	10,9	106,6
Medio 2	Or.	21,8	185,3
	Dp.	21,8	164,0

Para el medio 1 (original y duplicado), se aprecia una tendencia similar tanto en la D.O. como en la concentración celular másica alcanzada, observándose un periodo de adaptación del microorganismo de 6 h, en las cuales acondicionó su maquinaria celular a las nuevas condiciones del medio. El crecimiento en fase exponencial tuvo lugar entre las 6 h y las 30 h, con D.O. de 19,8 y 20,5, y concentraciones másicas celulares de $10,3 \text{ g/dm}^3$ y $10,8 \text{ g/dm}^3$ para los medios evaluados respectivamente.

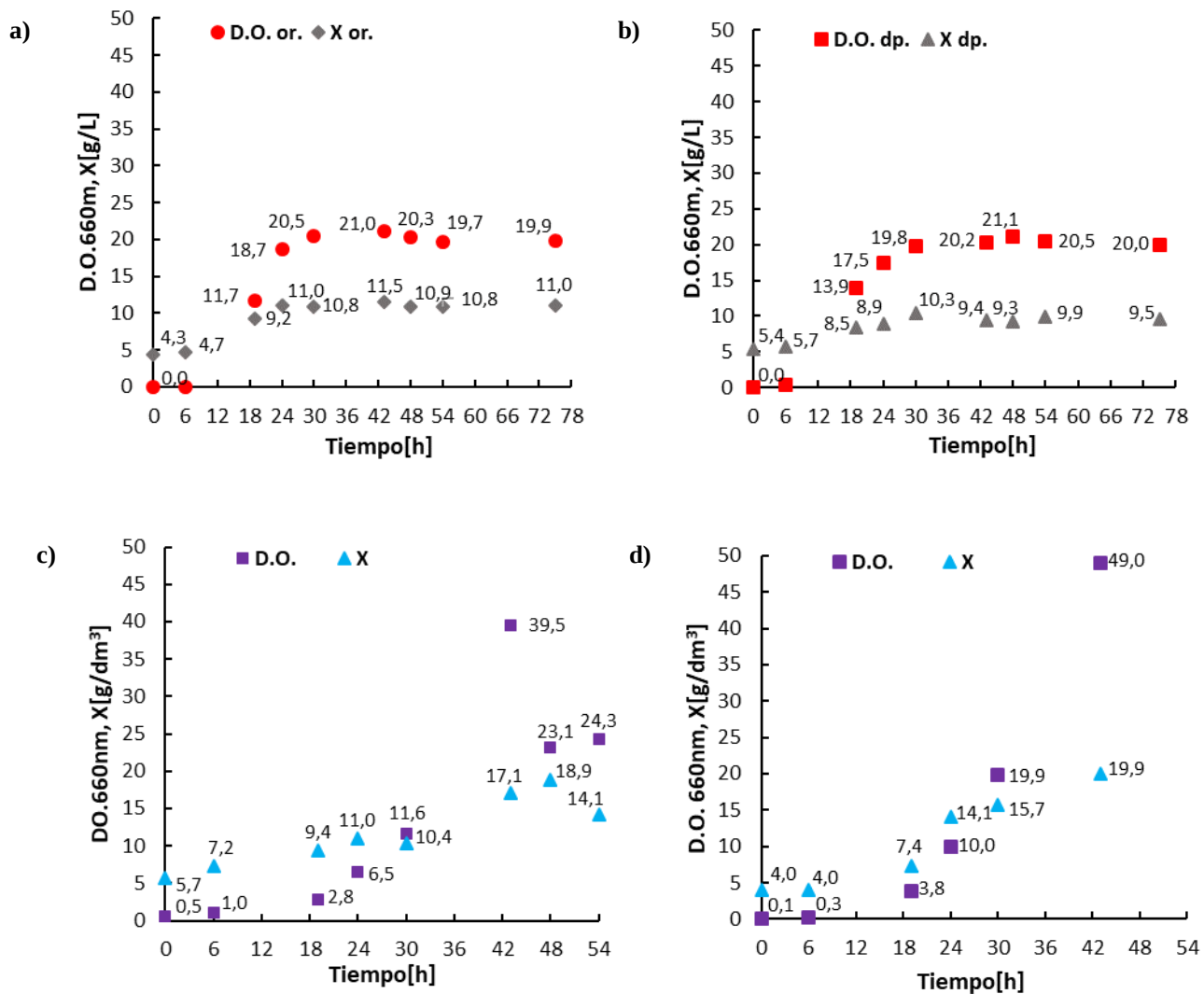


Figura 18. Crecimiento microbiano en términos de D.O._{660nm} y concentración másica celular (X), en las fermentaciones con *L. casei* ATCC 393, a 37°C, 130 rpm, a partir de lactosuero concentrado con S_0 de: a) 95,7 g/dm³; b) 106,6 g/dm³; c) 164,0 g/dm³; d) 185,3 g/dm³. or. y dp. (original y duplicado).

Por otra parte, el crecimiento microbiano para el medio 2 en ambos casos mostró una fase *lag* comprendida entre las 0 h y las 19 h, al encontrarse con un medio con una concentración de lactosa y CaCO₃ de casi 2 veces con respecto al medio 1, y aproximadamente 4 veces con respecto a las pruebas iniciales con los lactosueros pretratados de la sección anterior. El crecimiento exponencial se desarrolló entre las 19h y las 43h de fermentación con D.O. de 39,5 y 49,0 y concentraciones celulares másicas de 18,9 g/dm³ y 19,9 g/dm³, respectivamente. Luego de

las 43 h para el medio original y de las 54 h para el duplicado las características físicas del medio original empezaron a cambiar, tomando un aspecto coloidal hasta solidificarse por completo (Figura 19) lo cual llevó al cese de las fermentaciones.



Figura 19. Aspecto final de los caldos de fermentación en las pruebas con lactosuero concentrado para la prueba original y duplicado del medio 2, con *L. casei* ATCC 393 a 37°C, pH controlado y 130 rpm luego de 42 h y 54 h de fermentación respectivamente.

Así mismo, a las 24 h de fermentación se realizó el conteo de células viables (UFC/cm³) para los caldos de fermentación original y duplicado del medio 2 alcanzándose valores de $5,50 \cdot 10^{13}$ UFC/cm³ y $6,30 \cdot 10^{13}$ UFC/cm³, respectivamente, mientras que, a las 48 h en un nuevo recuento para el duplicado, se registró una concentración celular de $1,76 \cdot 10^{18}$ UFC/cm³ (para este tiempo no fue posible realizar el muestreo para el original).

Altioik *et al.* (2006) reportan un crecimiento celular máximo de 7,1 g/dm³ para una concentración inicial de lactosa en el lactosuero de 77,1 g/dm³ (la mayor analizada en su estudio). A resaltar el hecho de que son pocos los trabajos que presentan datos de crecimiento microbiano a altas concentraciones de lactosa en el medio (superiores a 100 g/dm³).

Se encontró una relación aproximadamente lineal entre la concentración inicial de lactosa del lactosuero en el medio y los valores máximos de D.O. y X (g/dm³) obtenidos, mostrando así que no hubo inhibición del crecimiento microbiano a los niveles de lactosa probados en el medio (Figura 20).

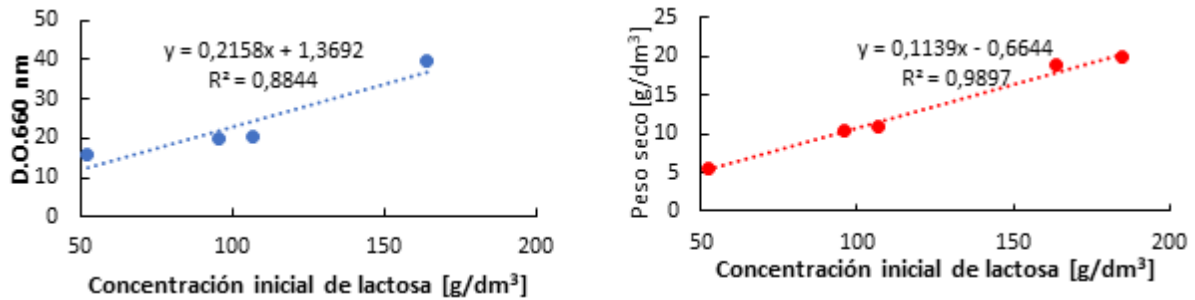


Figura 20. Ajuste lineal entre la concentración inicial de lactosa en el lactosuero y los valores máximos de D.O. 660nm y peso seco en fermentaciones con *L. casei* ATCC 393, a 37°C, pH controlado y 130 rpm.

En la Tabla 15, se listan las $\mu_{\text{máx}}$ registradas en cada caso, en donde cabe resaltar, la importante disminución en el valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtenido al aumentar la concentración inicial de lactosa, si se tiene en cuenta que para el medio con lactosuero concentrado a 52,3 g/dm³ este valor fue de 0,25 h⁻¹.

Tabla 15.
Velocidades específicas de crecimiento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) para los medios de fermentación 1 y 2 en fermentaciones con *L. casei* ATCC 393, a 37°C, pH controlado y 130 rpm.

Medio de fermentación			* $\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]
Medio 1	Or.	95,7g/dm³	0,04
	Dp.	106,6g/dm³	0,02
Medio 2	Or.	164,0g/dm³	0,02
	Dp.	185,3g/dm³	0,04

Nota: *Calculadas con base en $\ln(X/X_0)$ vs t.

Vaccari *et al.* (1993), trabajando con *L. casei* DSM 20011 (ATCC 393) en fermentaciones *batch* de glucosa comercial, en biorreactor equipado, con control automático de pH (NaOH 4N) volumen de trabajo de 3 dm³, reportan una disminución en $\mu_{\text{máx}}$ al aumentar su concentración inicial, pasando de 0,2 h⁻¹ para $S_0=40\text{g/dm}^3$ a 0,1 h⁻¹ para $S_0=120\text{ g/dm}^3$. En el presente estudio, se presentó una disminución más drástica en el valor de $\mu_{\text{máx}}$, sin embargo, se trabajó con un sustrato complejo (lactosuero concentrado) y no se llevó a cabo en un fermentador equipado, con control automático del pH como en el trabajo en mención.

Consumo de lactosa y producción de lactato: En la Figura 21 se muestran las cinéticas de consumo de lactosa y producción de lactato para los medios 1, y 2.

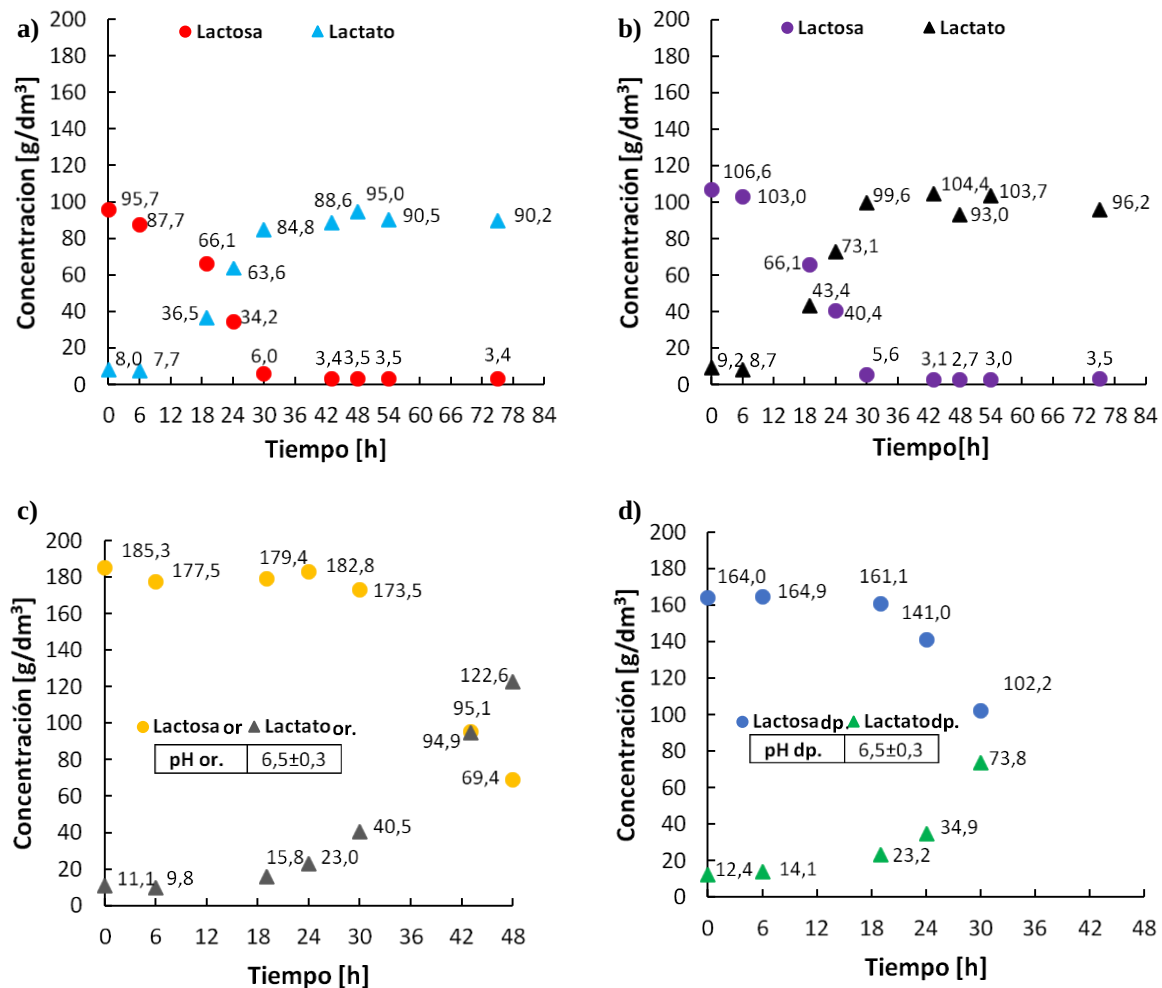


Figura 21. Cinéticas de consumo de lactosa y producción de lactato en las fermentaciones con *L. casei* ATCC 393 a 37°C, con control de pH, 130 rpm en el medio 1 a) original b) duplicado y medio 2 c) original, d) duplicado.

El comportamiento para el medio 1 fue muy similar tanto para el original como el duplicado, considerando que, a las 30 h de fermentación, se consumió el 94,7% y el 93,7% de la lactosa inicial con producciones máximas de lactato de 95,0 g/dm³ y 104,4 g/dm³, respectivamente. Las cinéticas de crecimiento microbiano y generación de lactato en estos casos muestran una producción fuertemente asociada al crecimiento, puesto que tanto el crecimiento como la producción del metabolito se detienen en tiempos muy cercanos.

La Tabla 16 muestra la comparación de datos de crecimiento y producción de este trabajo con lo reportado en la literatura para concentraciones de la fuente de carbono cercanas a 100 g/dm³.

Tabla 16.

Comparación entre fermentaciones reportadas en la literatura y el presente estudio para concentraciones de fuente de carbono cercanas a 100 g/dm³.

Trabajo	Fuente de carbono	S ₀ [g/ dm ³]	X _{máx} [g/ dm ³]	P _{máx} [g/ dm ³]	P [g/ dm ³ .h]	Y _{p/s} [g/g]	Y _{x/s} (g/g)
Vaccari <i>et al.</i> (1993)	Glucosa comercial	77,3	13,6	64,1	8,8	0,83	0,18
		99,5	14,2	81,9	9,1	0,82	0,14
		119,6	15,7	99,9	8,6	0,84	0,13
Hujanen & Linko (1996)	Glucosa comercial	100	-	100	2,1	1,0	-
Altiok, Tokatli & Harsa (2006)	Lactosuero en polvo	77,1	7,1	69,0	1,25	0,68	0,11
Actual	Lactosuero concentrado	95,7	10,3	87,0	2,9	0,94	0,06
		106,6	10,8	95,3	3,2	0,92	0,04

Hay una marcada diferencia en los valores de productividad obtenidos por Vaccari *et al.* (1993), sin embargo, sus fermentaciones fueron con medios simples y en un biorreactor de 3 dm³, en condiciones estrictas de anaerobiosis y control automático de pH, configuración deseable y que incide notablemente en el aumento de la productividad. Al comparar con los demás trabajos y con los resultados obtenidos en las fermentaciones con lactosuero sin concentrar, se destaca el notable aumento en la productividad al trabajar a este nivel de lactosa, manteniendo el Y_{p/s} y alcanzando producciones netas de lactato más altas con la misma concentración de los demás nutrientes y en modo de operación *batch*.

En el caso del medio 2, original y duplicado (Figura 21 c y d), se distingue como las curvas de consumo y producción se detienen a las 48 h para el medio original y a las 30 h para el duplicado; últimos muestreos posibles antes de que las fermentaciones se detuvieran por el cambio en las propiedades de los medios, como se mostró en la sección anterior (Figura 19). El

fenómeno presentado podría corresponder a la floculación progresiva del lactato de calcio coloidal generado, presente en concentraciones superiores a 100 g/dm^3 , en combinación con el carbonato de calcio y la lactosa residual en el medio.

Gao *et al.* (2009) en fermentaciones con glucosa grado analítico con concentraciones cercanas a 200 g/dm^3 y CaCO_3 , encontraron un comportamiento similar y mencionan que la velocidad de agitación está relacionada con la rapidez de la floculación en el medio, afirmando que agitaciones superiores a 100 rpm inducen una detención más rápida de las fermentaciones, quedando importantes niveles de lactosa residual. No se aprecia que las altas concentraciones de lactosa inicial hubiesen generado inhibición en el microorganismo, sino que la drástica modificación en las características físicas del medio interrumpió su actividad metabólica. En la Tabla 17 se resume el desempeño de estas fermentaciones.

Tabla 17.

Resumen parámetros de producción de lactato y consumo de lactosa en fermentaciones con L. casei ATCC 393, a 37°C, pH controlado y 130 rpm.

Medio		S_0 [g/dm ³]	$X_{\text{máx}}$ [g/dm ³]	$P_{\text{máx}}$ [g/dm ³]	P [g/dm ³ .h]	$Y_{p/s}$ [g/g]	$Y_{x/s}$
2	Or.	164	18,9	61,4	1,9	0,50	0,20
	Dp.	185,3	19,7	111,5	2,7	0,62	0,14

A manera de síntesis, el desempeño de las fermentaciones con lactosueros concentrados mostró como para el medio 1 (S_0 de $95,7 \text{ g/dm}^3$ y $106,6 \text{ g/dm}^3$), las fermentaciones se desarrollaron de buena manera, con rendimientos superiores al 90% y productividades hasta 1,7 veces superiores a las registradas en las pruebas con los medios con concentraciones de lactosa cercanas a 50 g/dm^3 , además de comportamientos cercanos, y en algunos aspectos, más ventajosos a lo reportado en la literatura incluso medios de fermentación simples.

Por otra parte, para el medio 2 se evidencia que a pesar de que las fermentaciones se detienen por la precipitación del lactato de calcio, se alcanzaron producciones netas de lactato altas, 61,4 g/dm³ y 111,5 g/dm³, y lo más interesante, que existe el potencial para que la fermentación siga desarrollándose si se mejora la manera de controlar el pH.

El control de pH con otro agente neutralizante de mayor solubilidad, como el NaOH, usado en distintos estudios, permitiría obtener un producto de fermentación final (lactato de sodio), con una solubilidad casi 10 veces mayor (999,6 g/dm³) en comparación con el lactato de calcio (90 g/dm³). Lo anterior, podría aumentar el límite superior alcanzable en la concentración de lactato, antes de que éste comience a flocular y se presente el cambio en las propiedades físicas del medio, tal como se mencionó anteriormente. Es importante señalar que el uso de CaCO₃ es una estrategia viable para el control de pH, en fermentadores que no cuenten con la instrumentación necesaria o para estudios de fermentaciones iniciales a nivel matraz.

3.3 Fase 3: Análisis de la fermentación láctica de lactosueros pretratados a través de modelamiento y simulación.

El pretratamiento del lactosuero mediante las etapas propuestas en este estudio permitió alcanzar un comportamiento cercano al del medio de referencia a partir de lactosa de grado analítico, y ventajas desde el punto de vista operacional que permitirían reducir los costos de una fermentación orientada a la obtención de ácido láctico o de alguna de sus sales. El análisis de los resultados obtenidos a través de modelamiento y simulación permite la evaluación de distintos esquemas de operación y su influencia sobre la productividad del bioproceso y la producción neta de lactato, además de una mejor comprensión de éste.

3.3.1. Modelamiento en modo de operación *batch*. Se realizó una revisión de los modelos cinéticos empleados en la literatura y se seleccionó el de mayor afinidad con el sustrato y las condiciones del presente trabajo. El modelo seleccionado fue el empleado por Altiok *et al.* (2006), con el cual describieron satisfactoriamente a nivel matraz, fermentaciones de lactosuero en polvo a distintas concentraciones iniciales de lactosa (S_0), igual concentración de la fuente de nitrógeno, cofactores, y CaCO_3 para el control de pH, además de la misma temperatura y agitación del medio.

De manera general, la acumulación de una especie en un reactor *batch* puede representarse como la diferencia entre sus velocidades de generación y consumo (Ec.7) y ser descrita en términos de la concentración del microorganismo el cual actúa como catalizador biológico (Ecs.8, 9, 11 y 13).

$$\sum r_{gen} - \sum r_{cons} = \frac{dy_i}{dt}$$

Ecuación 7.

$$\frac{dy_i}{dt} = q_i X$$

Ecuación 8.

Donde, y_i es la concentración de la especie, q_i es su velocidad específica de generación o consumo [h^{-1}].

Para el balance de biomasa (Ec.9), q_x corresponde a la velocidad específica de crecimiento microbiano, μ . La Ec.10 muestra la expresión utilizada por Altiok *et al.* (2006), en la cual se hace una corrección a la ecuación de *Monod*, al incluir dos términos hiperbólicos que ajustan la concentración microbiana a un límite máximo alcanzable determinado por efectos inhibitorios tanto de biomasa como de producto.

$$\mu X = \frac{dX}{dt}$$

Ecuación 9.

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{k_s + S} * \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^f * \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^h$$

Ecuación 10.

Donde, $\mu_{\text{máx}}$ = velocidad específica de crecimiento microbiano máxima [h^{-1}]; k_s = constante de afinidad por el sustrato [g/dm^3]; X_m = concentración inhibitoria de biomasa [g/dm^3]; P_m = concentración inhibitoria de ácido láctico [g/dm^3]; f y h = poderes tóxicos de biomasa y producto, respectivamente.

La generación de producto se representó mediante la conocida expresión de *Luedeking-Piret* para q_p (Ec.12), usada en diversos trabajos (Biazar *et al.*, 2003; Boonmee *et al.*, 2003; Ha *et al.*, 2003), con un término de estabilización adicional.

$$q_p * X = \frac{dP}{dt} \quad \text{Ecuación 11.}$$

$$q_p = Y_{P/X} * \mu + \beta \left(1 - \frac{S_{\text{res}}}{S}\right) \quad \text{Ecuación 12.}$$

Donde, $Y_{P/X}$ = coeficiente de rendimiento de producto asociado al crecimiento [g de lactato/ g de biomasa]; β =coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento [g de lactato/ g de biomasa]; S_{res} = concentración de sustrato residual [g/dm^3].

La expresión para el consumo de lactosa toma en cuenta el aporte del sustrato para la generación de nueva biomasa, la formación del producto y el mantenimiento celular (Ec.14).

$$q_s * X = \frac{dS}{dt} \quad \text{Ecuación 13.}$$

$$q_s = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} - \frac{q_p}{Y_{P/S}} - m_s \quad \text{Ecuación 14.}$$

Donde, $Y_{X/S}$ =rendimiento biomasa sustrato [g de biomasa/ g sustrato consumido]; $Y_{P/S}$ =rendimiento producto sustrato [g lactato/ g sustrato consumido] y m_s = coeficiente de mantenimiento celular [g de sustrato consumido/ g biomasa.h].

De esta manera, se obtuvo un modelo matemático no estructurado y no segregado, compuesto de 3 ecuaciones diferenciales y 12 parámetros a ser estimados (Ecs. 15, 16 y 17). La solución del sistema se llevó a cabo mediante una rutina programada en el software *Matlab R2019a*, haciendo uso del solver *ODE45* acoplado al optimizador *lsqnonlin-lsqcurvefit* para la búsqueda de los

parámetros cinéticos, teniendo como función objetivo a minimizar, el error cuadrático medio entre los datos experimentales y los arrojados por la simulación (Ec. 18).

$$\frac{dX}{dt} = \left[\frac{\mu_{\max} * S}{k_s + S} * \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^f * \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^h \right] * X$$

Ecuación 15.

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} * \frac{dX}{dt} + \beta * X \left(1 - \frac{S_{res}}{S}\right)$$

Ecuación 16.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{dX}{dt} \frac{1}{Y_{X/S}} - \frac{dP}{dt} \frac{1}{Y_{P/S}} - m_S * X$$

Ecuación 17.

$$F_{obt} = \sum_i^N (F(x, xdata_i) - ydata_i)^2$$

Ecuación 18.

Las Figuras 22, 23 y 24 muestran las cinéticas de producción de lactato, consumo de lactosa y crecimiento microbiano, para el medio de referencia basado en lactosa comercial con S_0 de 45 g/dm³, y los medios a partir de lactosuero concentrado con S_0 de 52,3 g/dm³ y 95,7 g/dm³, mientras que en la Tabla 18 se listan los parámetros cinéticos obtenidos en cada caso.

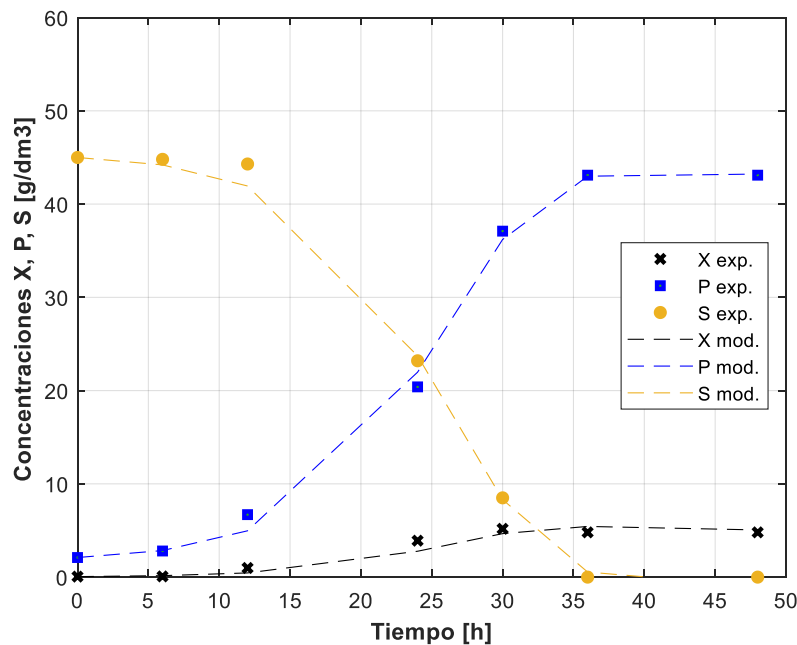


Figura 22. Cinéticas de fermentación experimentales (exp) y modeladas (mod) en fermentación en modo batch para el medio de referencia a partir de lactosa grado analítico con (S_0 de 45 g/dm³) con *L. casei* a 37°C y 130 rpm.

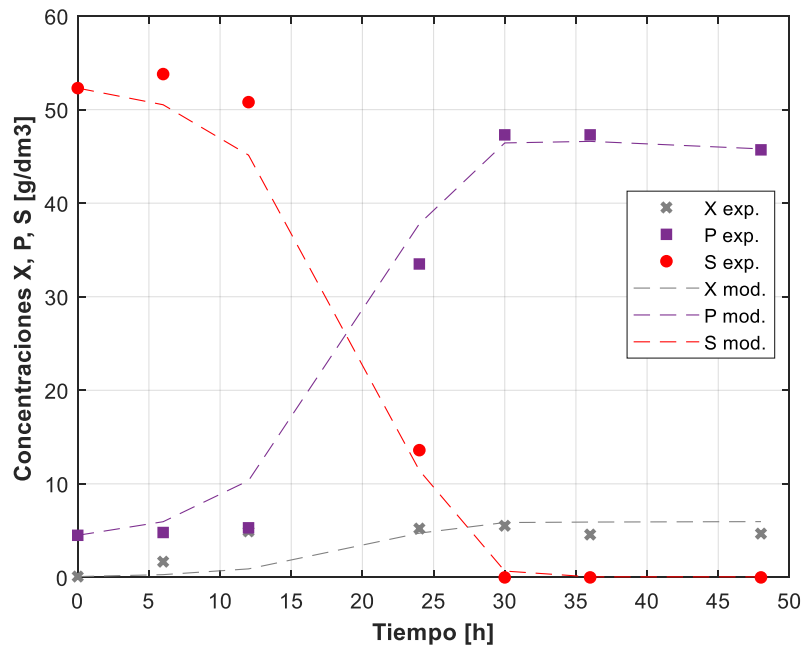


Figura 23. Cinéticas de fermentación experimentales (exp) y modeladas (mod) en fermentación en modo *batch* para el medio a partir de lactosuero concentrado con S_0 de 52,3 g/dm³, con *L. casei* a 37°C y 130 rpm.

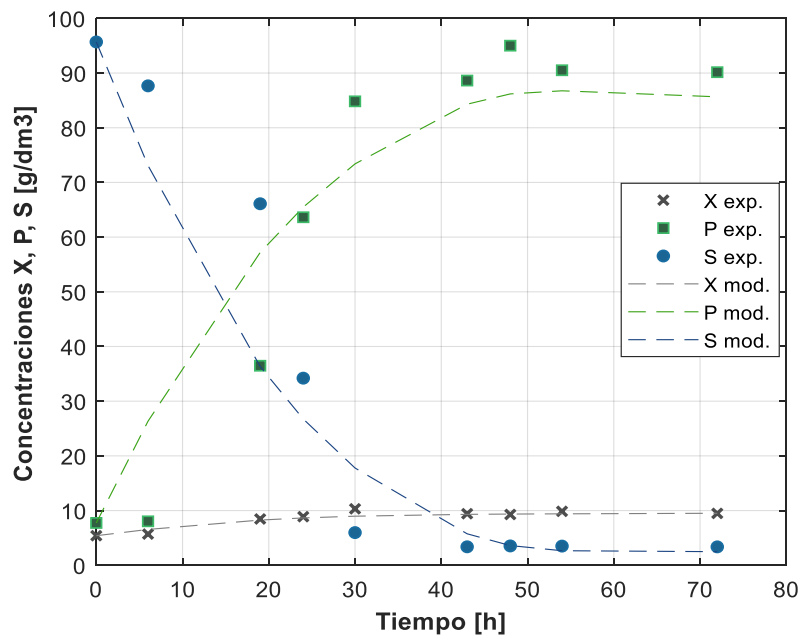


Figura 24. Cinéticas de fermentación experimentales (exp) y modeladas (mod) en fermentación en modo *batch* para el medio a partir de lactosuero concentrado con S_0 de 95,7 g/dm³, con *L. casei* a 37°C y 130 rpm.

Tabla 18.
Optimización de parámetros cinéticos en los distintos medios de fermentación.

Parámetros	Medio de referencia	Lactosuero procesado	
S_0 [g/dm ³]	45,0	52,3	95,7
$\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]	0,26	0,25	0,11
k_s [g/dm ³]	18,30	10,72	74,31
X_m [g/dm ³]	11,63	9,72	10,70
f	0,35	0,20	0,62
P_m [g/dm ³]	85,77	90,72	150,00
g	0,41	0,80	0,50
$Y_{p/x}$ [g/g]	6,99	7,00	14,00
β [g/g]	0,05	0,02	0,07
S_{res} [g/dm ³]	0,00	0,10	3,00
$Y_{x/s}$ [g/g]	0,81	0,72	0,21
$Y_{p/s}$ [g/g]	1,14	0,98	1,10
m_s [g/g.h]	0,03	0,01	0,01
SSE	0,0928	0,8213	0,5202
R^2	0,9759	0,8590	0,8042

De manera general, se aprecia una alta similitud en los parámetros calculados para el medio de referencia y el lactosuero concentrado ($S_0=52,3$ g/L), lo cual es acorde a los resultados experimentales mostrados en las secciones anteriores. Los parámetros que describen el crecimiento y mantenimiento microbiano muestran en primer lugar $\mu_{\text{máx}}$ muy cercanas (0,26 h⁻¹ y 0,25 h⁻¹) y similares a las obtenidas de manera experimental (0,31 h⁻¹ y 0,25 h⁻¹); mayor afinidad por el medio de referencia ($k_s=18,30$ g/dm³), concentraciones microbianas inhibitorias muy cercanas (11,63 g/dm³ y 9,72 g/dm³), rendimientos biomasa sustrato ($Y_{x/s}$) de 0,81 g/g y 0,72 g/g y coeficientes de mantenimiento celular de bajo orden de magnitud ($m_s \leq 0,03$ g/g.h).

Cabe resaltar que los valores obtenidos de la simulación para $Y_{x/s}$ son altos al compararlos con los calculados de manera experimental (0,11 y 0,10 g de biomasa producida/g de lactosa consumida). Esta diferencia radica principalmente en el método de cálculo utilizado en cada caso, teniendo en cuenta que los valores experimentales se obtuvieron mediante la relación entre la producción neta de biomasa y el consumo neto de lactosa, mientras que en la simulación se

calcularon de una manera más compleja, por medio de la optimización de parámetros de un sistema de ecuaciones diferenciales. Lo anterior se soporta en que los análisis cromatográficos mostraron únicamente a la lactosa como fuente de carbono disponible en todas las pruebas, tal como se reporta en la literatura para el lactosuero.

Los parámetros relacionados a la formación de producto muestran concentraciones inhibitorias de éste superiores a las alcanzadas experimentalmente (en más del 80%); lo cual sugiere que los medios de fermentación en consideración estuvieron lejos de alcanzar inhibición por producto. La producción de lactato estuvo esencialmente asociada al crecimiento microbiano, como lo muestran los valores de $Y_{p/x}$ y β obtenidos, mientras que los rendimientos producto sustrato fueron cercanos a 1; levemente superiores a los obtenidos de manera experimental con respecto al consumo de lactosa.

Por otra parte, los parámetros de las fermentaciones con lactosuero concentrado con S_0 de 95,7 g/dm³, mostraron reducción en $\mu_{m\acute{a}x}$ (0,11 h⁻¹), incremento en la constante de afinidad por sustrato (74,31 g/dm³) y una concentración inhibitoria de producto superior en un 58% a la alcanzada experimentalmente. A resaltar que el valor obtenido para $Y_{p/x}$ fue de aproximadamente el doble con respecto a los dos medios analizados anteriormente, para los cuales en la fase exponencial de crecimiento se produjeron aproximadamente 7 g de lactato por g de biomasa generada, mientras que para el medio con S_0 de 95,7 g/dm³ se produjeron aproximadamente 14 g de lactato por g de biomasa. En la Tabla 19 se muestran algunos de los parámetros cinéticos reportados en distintos estudios de fermentaciones lácticas a partir de distintos sustratos y con distintas especies del género *Lactobacillus*.

Tabla 19.

Parámetros cinéticos obtenidos en diversos trabajos, en fermentaciones lácticas con distintos microorganismos y sustratos.

Sustrato	S ₀	μ _{máx}	k _s	Y _{p/x}	β	m _s	Y _{x/s}	Y _{p/s}	Estudio
Lactosuero pretratado	52,3	0,25	10,72	7,00	0,02	0,01	0,72	0,98	Actual
Lactosuero Desproteinizado	50,0	0,25	0,9	4,6	0,23	2,65	0,06	0,61	*Biazar <i>et al.</i> , (2003)
Lactosuero en polvo	77,1	0,27	0,72	4,08	0,06	0,03	0,16	0,68	Altioik <i>et al.</i> (2006)
Lactosa grado analítico	45,0	0,26	18,31	6,99	0,05	0,03	0,81	1,14	Actual
Lactosa g. analítico	40	0,36	44,4	-	-	-	-	1,02	Fu & Mathews (1999)
Lactosa g. analítico	100	1,1	1,32	0,39	3,02	-	-	0,93	Boonmee <i>et al.</i> , (2003)

Nota: * Estudio sin control de pH.

En la mayor parte de los estudios, parámetros importantes como el rendimiento producto/sustrato presentan un valor cercano entre ellos, superior a 0,60 g de lactato/g de lactosa consumida en todos los casos; la formación de producto estuvo esencialmente asociada al crecimiento (bajos valores de β), con excepción de lo obtenido con la cepa *L. lactis* (β=3,02). La diferencia en los demás parámetros estaría relacionada con la cepa utilizada y las condiciones de fermentación.

3.3.2 Modelamiento de la fermentación láctica en modo de operación fed-batch: Una de las estrategias para mejorar la productividad de un bioproceso es la modificación de su modo de operación. El modo *fed-batch* ampliamente usado en distintos procesos biotecnológicos, permite evitar el rápido cese de los procesos metabólicos por agotamiento de los nutrientes en el medio. Con la alimentación progresiva de sustrato fresco a una concentración determinada, podrían alcanzarse mayores producciones netas y/o productividades de lactato en comparación con el modo *batch*.

A continuación, se describen las ecuaciones de balance en la configuración *fed- batch* para la fermentación láctica: balance global del proceso (Ec.19), balance para cada especie (Ec.20) y velocidad de dilución D (Ec.21). A éstas se adicionan las ecuaciones para μ (Ec.10), q_p (Ec.12) y q_s (Ec.14), y los parámetros cinéticos anteriormente calculados.

$$F_I = \frac{dV}{dt}$$

Ecuación 19.

$$\frac{dV y_i}{dt} = \sum V * r_{gen} - \sum V * r_{cons} + F_I y_i$$

Ecuación 20.

$$D = \frac{F_I}{V}$$

Ecuación 21.

Donde, F_I = Flujo de entrada [dm^3/h]; V =Volumen de fermentación [dm^3]; r_{gen} y r_{cons} = velocidades de generación y consumo [$\text{g}/\text{dm}^3.\text{h}$]; y_i =concentración de la especie entrante. El modelo matemático *fed-batch* se representa de manera detallada en las Ecs. 22, 23 y 24.

$$\frac{dX}{dt} = \left[\frac{\mu_{max} * S}{k_s + S} * \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^f * \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^h - D \right] * X$$

Ecuación 22.

$$\frac{dP}{dt} = \left[Y_P \frac{\mu_{max} * S}{\bar{X} * k_s + S} * \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^f * \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^h + \beta \left(1 - \frac{S_{res}}{S}\right) \right] * X - P * D$$

Ecuación 23.

$$\frac{dS}{dt} = \left[-\frac{\mu_{max} * S}{k_s + S} * \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^f * \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^h * \left[\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{Y_P}{Y_P} \right] - \frac{\beta * \left(1 - \frac{S_{res}}{S}\right)}{Y_P} - m_s \right] * X + D(S_0 - S)$$

Ecuación 24.

En las Figuras 25 y 26 se muestran los perfiles de concentración simulados para los medios de fermentación correspondientes a lactosuero concentrado con S_0 de $52,3 \text{ g}/\text{dm}^3$ y $95,7 \text{ g}/\text{dm}^3$ final.

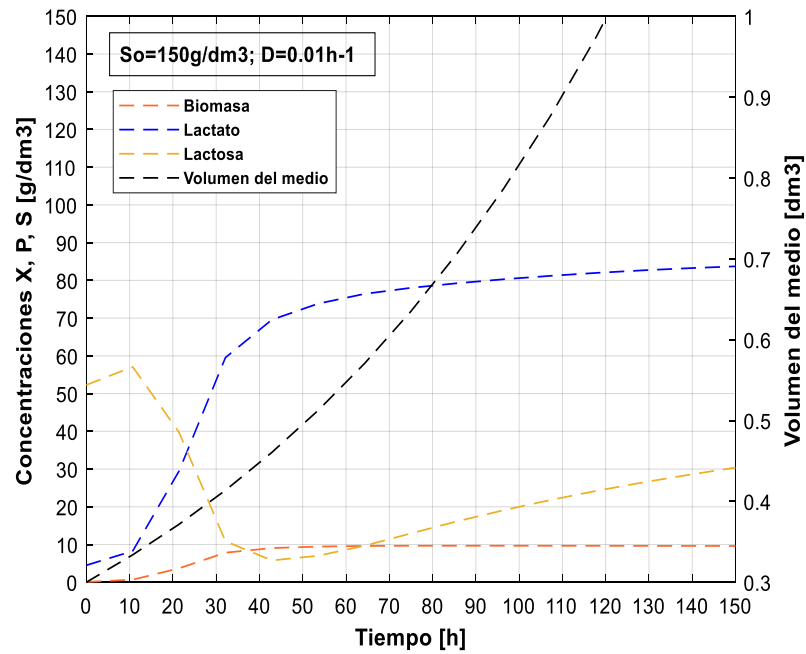


Figura 26. Perfiles de concentración de producto, sustrato y biomasa en simulación en modo *fed-batch* para el medio con lactosuero concentrado a $52,3 \text{ g/dm}^3$ de lactosa, con $D=0,01 \text{ h}^{-1}$ y $S_0= 200 \text{ g/dm}^3$

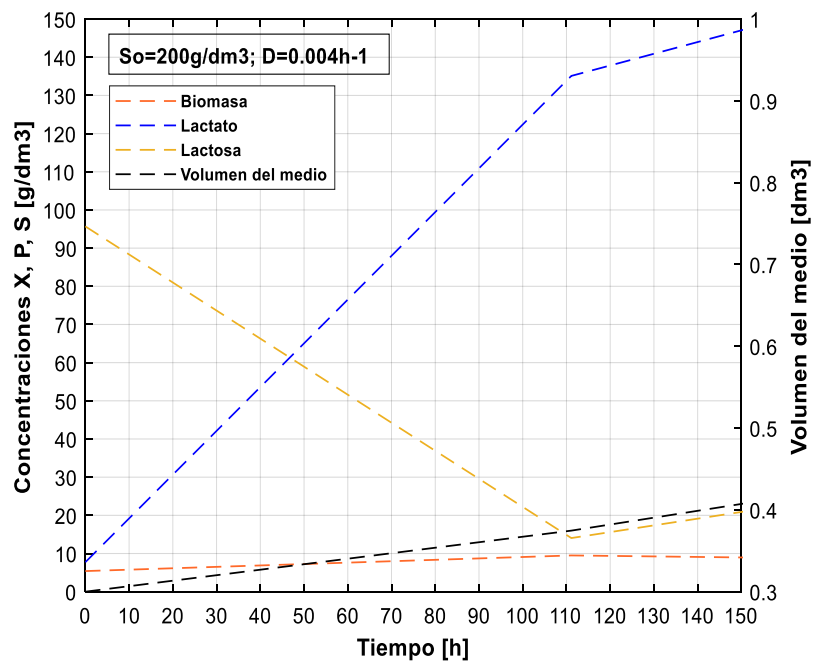


Figura 29.. Perfiles de concentración de producto, sustrato y biomasa en simulación en modo *fed-batch* para el medio con lactosuero concentrado a $95,7 \text{ g/dm}^3$ de lactosa, con $D=0,004 \text{ h}^{-1}$ y $S_0= 200 \text{ g/dm}^3$.

Las velocidades de dilución y las concentraciones de solución de alimentación (que provendría de lactosuero concentrado) seleccionadas fueron de $0,010 \text{ h}^{-1}$ y $0,004 \text{ h}^{-1}$, y 150 g/dm^3 y 200 g/dm^3 respectivamente. Estas condiciones fueron escogidas de acuerdo con un diseño factorial 3^2 , alimentado a la simulación en donde se varió D y S_0 a 3 niveles diferentes obteniendo como mejores condiciones las mencionadas anteriormente, bajo el criterio de mayor producción de lactato, menor concentración de lactosa residual y mayor volumen del caldo de fermentación

En la Tabla 20 se realiza una comparación entre la productividad y la producción neta de lactato, entre los datos experimentales obtenidos en la fermentación *batch* y los simulados para el modo de operación *fed-batch*, para el lactosuero concentrado a S_0 de $52,3 \text{ g/dm}^3$ y $95,7 \text{ g/dm}^3$.

Tabla 20.

Comparación parámetros productivos entre modos de operación *batch* y *fed-batch* para las fermentaciones con lactosuero concentrado a S_0 de $52,3 \text{ g/dm}^3$ y $95,7 \text{ g/dm}^3$.

S_0 [g/dm ³]	Productividad [g/ dm ³ .h]		Producción neta de lactato [g/dm ³]		Volumen final caldo de fermentación [cm ³]	
	<i>batch</i>	<i>fed-batch</i>	<i>batch</i>	<i>fed-batch</i>	<i>batch</i>	<i>fed-batch</i>
52,3	1,9	1,1	45,7	74,8	300	600
95,7	2,9	1,0	95,3	115,2	300	483

Se observa un incremento importante en la concentración neta de lactato alcanzada al final de las dos fermentaciones *fed-batch*, de aproximadamente 39% y 17%; sin embargo, con una reducción mayor en la productividad, aproximadamente del 44% y 67% para los medios con S_0 de $52,3 \text{ g/dm}^3$ y $95,7 \text{ g/dm}^3$, respectivamente.

Con base en estos resultados, serían de mayor interés realizar las fermentaciones en modo *batch* con lactosuero concentrado a S_0 de $95,7 \text{ g/dm}^3$ al tenerse al final de éstas, altas concentraciones de lactato con altas productividades volumétricas y concentraciones de lactosa

residual menores a 5 g/dm^3 , facilitando así las posteriores etapas de recuperación del producto final.

4. Conclusiones

La etapa de desproteinización de lactosuero permitió alcanzar en primer lugar, un rendimiento de separación de proteína (requesón) de $47,1 \text{ g requesón/dm}^3$ lactosuero, acorde a lo reportado en la literatura; la clarificación en filtro prensa mostró estar dominada principalmente por la resistencia del medio filtrante, superior en cerca de 3 órdenes de magnitud a la resistencia de la torta. La integración de estas dos etapas permitió una reducción del 40% en la proteína y del 96,5% en la turbidez referidas al lactosuero inicial, además de la obtención de un subproducto de alto valor nutricional que podría ser integrado al esquema de producción de lactato como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica. Finalmente, en la concentración por evaporación de película descendente al vacío, se obtuvieron concentrados a un FCV de 4,1 y 4,2 con %p/p de sólidos entre $23,68 \pm 0,11$ y $21,71 \pm 0,02$ (4,1 y 3,5 veces superior al lactosuero inicial) y un %p/p de lactosa de $19,65 \pm 0,06$ y $17,71 \pm 0,02$; sin afectación de las características fisicoquímicas requeridas para su uso como sustrato en la fermentación.

Se evaluó uso de lactosueros pretratados como sustratos en la fermentación láctica, encontrando que bajo control de pH con CaCO_3 en el intervalo deseado (6,3 - 6,6), se alcanzó en todas las pruebas a $S_0 \sim 50 \text{ g/dm}^3$, el consumo total de la lactosa, concentraciones celulares máximas de 10^{11} UFC/cm^3 , Yp/s y productividades promedio de $0,92 \pm 0,03 \text{ g/g}$ y $1,60 \pm 0,14 \text{ g/dm}^3\cdot\text{h}$; $0,77 \pm 0,03 \text{ g/g}$ y $1,25 \pm 0,21 \text{ g/dm}^3\cdot\text{h}$; $0,87 \pm 0,08 \text{ g/g}$ y $1,65 \pm 0,35 \text{ g/dm}^3\cdot\text{h}$, para los medios con lactosuero entero, desproteinizado y concentrado respectivamente. Al comparar con el Yp/s ($0,88 \pm 0,04 \text{ g/g}$), y la productividad ($0,95 \pm 0,21 \text{ g/dm}^3\cdot\text{h}$) obtenidos con el medio de

referencia basado en lactosa grado analítico, se evidencia el buen potencial del lactosuero como sustrato de bajo costo en la producción de lactato.

Las fermentaciones con lactosueros concentrados a S_0 cercanos a 100 g/dm^3 permitieron aumentar hasta 1,7 veces la productividad con respecto al lactosuero sin concentrar, con rendimientos superiores a $0,9 \text{ g/g}$, manteniendo la misma composición de los demás nutrientes del medio y las condiciones de % de inóculo, agitación y temperatura, alcanzando concentraciones máximas de lactato de hasta $95,3 \text{ g/dm}^3$. Para las pruebas con S_0 cercanas a 200 g/dm^3 , la floculación progresiva generó la solidificación del medio, deteniendo así las fermentaciones a concentraciones de lactato de calcio entre $102,2 \text{ g/dm}^3$ y $122,6 \text{ g/dm}^3$, sin embargo, se alcanzaron producciones netas de lactato altas, $61,4 \text{ g/dm}^3$ y $111,5 \text{ g/dm}^3$, mostrando que existe el potencial para que la fermentación siga desarrollándose si se mejora la manera de controlar el pH.

Se consiguió simular las cinéticas de fermentación experimentales y obtener 12 parámetros cinéticos, con un mejor ajuste para el medio de referencia ($r^2 \sim 0,98$) con respecto a los medios basados en lactosuero ($r^2 \sim 0,86$ y $0,80$). Se encontró una alta similitud en los parámetros cinéticos para lactosuero procesado a $S_0 \sim 50 \text{ g/dm}^3$ con respecto al medio de referencia, destacándose la generación de producto asociada fuertemente al crecimiento con un $Y_{p/x}$ de $7 \text{ g de lactato/g biomasa producida}$, además de bajos coeficientes de mantenimiento celular. Para el medio de fermentación basado en lactosuero concentrado procesado ($S_0 \sim 100 \text{ g/dm}^3$) se observó un notable aumento en $Y_{p/x}$ al producirse $14 \text{ g de lactato/g de biomasa}$, confirmando el aumento en la productividad visto experimentalmente en las fermentaciones con lactosuero concentrado a este nivel.

Finalmente, el análisis de las fermentaciones en modo de operación *fed-batch* y su comparación con los resultados experimentales obtenidos en *batch*, mostró en los dos casos analizados, lactosuero pretratado a S_0 de ~ 50 g/dm³ y 100 g/dm³, un considerable descenso en la productividad de 44% y 67% respectivamente, con lo cual sería deseable el escalamiento de las fermentaciones en modo *batch* con estos dos medios, como estrategia más favorable desde el punto de vista productivo.

5. Recomendaciones

Evaluar, para la desproteinización, la implementación de tanques enchaquetados de geometría cónica, que permitan un suministro de calor más homogéneo y un drenado más fácil del lactosuero desproteinizado.

Para las fermentaciones a partir de lactosuero concentrado con $S_0 \sim 100$ g/dm³ ajustar ciertas condiciones de fermentación, tales como el % de inóculo y la relación C/N, en busca de reducir el tiempo de adaptación detectado (6 h) y así mejorar la productividad. Para fermentaciones con S_0 superiores a 100 g/dm³, controlar el pH mediante la adición automática de un compuesto de mayor solubilidad como el NaOH, entre otros.

Evaluar el uso de la proteína hidrolizada del lactosuero como fuente de carbono en fermentaciones de lactosuero pretratado con control de pH, mediante un diseño experimental que permita determinar la concentración más favorable en cada caso.

Estudiar la recuperación del lactato de calcio y/o el ácido láctico obtenido mediante técnicas como la clarificación con membranas, la concentración por evaporación al vacío y la electrodiálisis.

Realizar una evaluación económica del proceso en *batch* integrando: etapas de pretratamiento del lactosuero, fermentación y recuperación del producto.

Validar el modelo *fed-batch* mediante pruebas experimentales.

Referencias Bibliográficas

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 286-301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
- Åkerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G., & Hahn-Hägerdal, B. (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 682-690. <https://doi.org/10.1007/s002530051232>
- Altıok, D., Tokatlı, F., & Harsa, Ş. (2006). Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(7), 1190-1197. <https://doi.org/10.1002/jctb.1512>
- Amelia Ríos Castro. (2011). Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de lactosuero usando tecnología de membranas (Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
- 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(9), 827–834.
- Benninga, H. (1990). A History of Lactic Acid Making: A Chapter in the History of Biotechnology. Springer Science & Business Media.
- Biazar, J., Tango, M., Babolian, E., & Islam, R. (2003). Solution of the kinetic modeling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. *Applied Mathematics and Computation*, 144(2), 433-439. [https://doi.org/10.1016/S0096-3003\(02\)00418-6](https://doi.org/10.1016/S0096-3003(02)00418-6)
- Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W., & Rogers, P. L. (2003). Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: Experimental data and model development. *Biochemical Engineering Journal*, 14(2), 127-135. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00171-7)

- Bosco F., Carletto R.A., & Marmo L. (2018). An integrated cheese whey valorization process. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 379-384. <https://doi.org/10.3303/CET1864064>
- Bouguettoucha, A., Balannec, B., & Amrane, A. (2011). Unstructured Models for Lactic Acid Fermentation – A Review. 10.
- Büyükkileci, A. O., & Harsa, S. (2004). Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(9), 1036-1040. <https://doi.org/10.1002/jctb.1094>
- Bylund, G. (2015). *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak.
- Cáceres, S., & Mora, S. (2017). Evaluación del esquema “filtración con membrana / evaporación de película / secado por aspersión” como alternativa de tratamiento para la valorización de lactosuero ácido. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., & Guha, A. K. (2008). Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.006>
- Correa, C., & Monroy, D. (2019). Preparación de Concentrados a partir de extractos de pulpa de café mediante evaporación de película descendente como estrategia de aprovechamiento para el diseño de productos alimenticios. Universidad Industrial de Santander.
- Cury Regino, K., Arteaga Márquez, M., Martínez Flórez, G., Luján Rhenals, D., & Durango Villadiego, A. (2014). Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 137-145. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44281>
- DANE. (2002, 2017). Encuesta anual manufacturera (EAM) [Gubernamental]. Recuperado 29 de junio de 2019, de DANE información para todos. website: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/industria/encuesta-anual-manufacturera-enam>

- Ding, S., & Tan, T. (2006). l-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41(6), 1451-1454. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.014>
- Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Acribia, Editorial, S.A.
- Duarte, P., (2018). Evaluación de las proteínas hidrolizadas del lactosuero como fuente de nitrógeno en la fermentación acidoláctica de la lactosa (Pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), 163-170. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00014-5)
- Gao, M.-T., Hirata, M., Toorisaka, E., & Hano, T. (2009). Development of a fermentation process for production of calcium-l-lactate. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 464-469. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.06.002>
- García, C. (2011). Producción de ácido l (+) láctico a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus Casei* en un cultivo batch. Universidad de Córdoba, España.
- García, C., Arrázola, G., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1).
- Garcia, O., Ochoa, I., Novoa, C., Baylon, C., Granados, F., Duque, Ó., & Murcia, R. (1987). Procesamiento de quesos cocidos-preparación de requesón. Manual de formación, Centro agropecuario de la sabana.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., ... Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002>
- Ha, M.-Y., Kim, S.-W., Lee, Y.-W., Kim, M.-J., & Kim, S.-J. (2003). Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei*

- KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 134-140.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2), 87-107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6)
- Hujanen, M., & Linko, Y.-Y. (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied microbiology and biotechnology*, 45(3), 307–313.
- Krischke, W., Schröder, M., & Trösch, W. (1991). Continuous production of l-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 573-578. <https://doi.org/10.1007/BF00167901>
- Kumaran, P., & Paruchuri, Y. L. (1997). Kinetics of phenol biotransformation. *Water Research*, 31(1), 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)80001-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)80001-3)
- Mccabe, W. (2007). Operaciones unitarias en ingeniería química (Edición: 7). México (D.F.); Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Miller, C., Fosmer, A., Rush, B., McMullin, T., Beacom, D., & Suominen, P. (2017). Industrial Production of Lactic Acid ☆. En *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09142-1>
- Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, N., Fallahpour, M., Mohseni, F. A., & Bakhtiari, M. R. (2002). Comparison of Lactic Acid Isomers Produced by Fungal and Bacterial Strains. *Iranian Biomedical Journal*, 7.
- Muñoz, C., & Solano, R. (2014). Construcción e implementación de un piloto de laboratorio de evaporación de película descendente. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Nandasana, A. D., & Kumar, S. (2008). Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.014>

- Nielsen, J., & Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, 47(17), 4225-4270. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)85104-J](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)85104-J)
- Ortega Quintana, F. A., Alvarez, H., Botero Castro, H. A., Ortega Quintana, F. A., Alvarez, H., & Botero Castro, H. A. (2017). Facing bioprocess modeling: A review of the methodologies of modeling. *Revista ION*, 30(1), 73-90. <https://doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017006>
- Parra, R., (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967-4982.
- Pinelli, D., González-Vara, A. R., Matteuzzi, D., & Magelli, F. (1997). Assessment of kinetic models for the production of l- and d-lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* DMS 20011 and *Lactobacillus coryniformis* DMS 20004 in continuous fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(2), 209-212. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)83586-6](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)83586-6)
- Puente, F. V., Arroyo, V., & Frías, M. (2010). Precipitación de proteínas lactoséricas en función de la acidez, temperatura y tiempo, de suero producido en Comonfort, Guanajuato, México. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 157–169.
- Riera, F., González, P., & Muro, C. (2016). Whey cheese: Membrane technology to increase yields. *Journal of Dairy Research*, 83(1), 96-103. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000679>
- Ríos Castro, A. (2011). *Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de lactosuero usando tecnología de membranas*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Salminen, S., & Wright, A. von (Eds.). (1998). *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects* (2nd ed., rev. and expanded). New York: Marcel Dekker.
- Shah, P. S., Fan, L. T., Kao, I. C., & Erickson, L. E. (1972). Modeling of Growth Processes with Two Liquid Phases: A Review of Drop Phenomena, Mixing, and Growth. En D. Perlman (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 15, pp. 367-414). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70097-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70097-2)

- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2000). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts* (Edición: 2nd edition). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Tanguy, G., Siddique, F., Beaucher, E., Santellani, A.-C., Schuck, P., & Gaucheron, F. (2016a). Calcium phosphate precipitation during concentration by vacuum evaporation of milk ultrafiltrate and microfiltrate. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 554-562. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.023>
- Tanguy, G., Siddique, F., Beaucher, E., Santellani, A.-C., Schuck, P., & Gaucheron, F. (2016b). Calcium phosphate precipitation during concentration by vacuum evaporation of milk ultrafiltrate and microfiltrate. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 554-562. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.023>
- Vaccari, G., y González-Vara, A. R., Campi, A. L., Dosi, E., Brigidi, P., & Matteuzzi, D. (1993). Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(1), 23–27.
- Vázquez, J. A., & Murado, M. A. (2008). Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 276-287.
- Vijayakumar, J., Thangavelu, V., & Rajendran, A. (2008). Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly (cabeq@pbf.hr)*; Vol.22 No.2, 22.
- Yin, P., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Pakr, Y., & Okabe, M. (1997). Enhanced production of l(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(3), 249-253. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82063-6](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82063-6)